

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
HIPOGLICÊMICA DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA  
FORFICATA***

ELIANDRA DE SOUSA

Florianópolis  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
HIPOGLICÊMICA DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA  
FORFICATA***

Dissertação apresentada por ELIANDRA DE SOUSA para obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Bruno Szpoganicz

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

Florianópolis  
2003

SOUSA, Eliandra.

**Estudo fitoquímico e a avaliação da atividade hipoglicêmica da espécie vegetal *Bauhinia forficata*/Eliandra de Sousa.** Florianópolis, 2003. 91p.

Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Pós Graduação em Química.

1. *Bauhinia forficata*; 2. Atividade hipoglicêmica; 3. Flavonóides glicosilados

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
HIPOGLICÊMICA DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA*  
*FORFICATA***

Apresentada por

**ELIANDRA DE SOUSA**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores:

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Bruno Szpoganicz  
(Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva  
(Co-orientadora)

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Inês Maria Costa Brighente

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria da Graça Fauth

---

Prof<sup>o</sup>. Dr Faruk José Nome Aguilera  
(Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química)

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2003.

Se todos os seus esforços forem vistos com indiferença, não desanime... Porque também o sol, ao nascer, dá um espetáculo todo especial e, no entanto a maioria da platéia continua dormindo.

(Anônimo)

Dedico este trabalho aos meus pais, Wilmar e Teresinha, e ao meu eterno companheiro Mário.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por mostrar o caminho certo a ser seguido.

Aos professores Bruno Szpoganicz, Moacir Geraldo Pizzollatti e Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela orientação, dedicação, amizade, compreensão, valiosos ensinamentos e incentivos mostrados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores membros da banca, Tereza Cristina Rozone de Souza, Inês Maria Costa Brighente e Maria da Graça Fauth, pelas valiosas contribuições.

À Professora Dra. Tânia Beatriz Crecznski Pasa, pela colaboração com equipamentos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Laura Leite, pelos ensinamentos na indução do Diabetes.

Ao Professor Raimundo Braz Filho pela contribuição na identificação dos compostos isolados.

Ao Professor Daniel de Barcellos Falkenberg pela identificação botânica da espécie vegetal estudada.

Aos meus pais, Wilmar e Teresinha, pelo apoio e incentivo que sempre me deram em todas as escolhas da minha vida.

Ao Mário, que carinhosamente esteve ao meu lado sofrendo com minhas angústias e vibrando com minhas realizações.

Aos meus irmãos Evandro, Alessandro, Lisandra e Ana Luiza e aos meus sobrinhos, Bruna e Juninho pelo carinho ao longo desta caminhada.

Ao amigo Anildo Cunha Junior pela amizade e colaboração nas inúmeras discussões sobre os resultados, na elaboração deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Ana Paula, Ariane, Cláudia, Cinira, Danusa, Denise, Erineu, Gledir, Karine, Marcela e Veronika pelos momentos de amizade e agradável convivência.

A minhas queridas alunas de iniciação científica Maria Alice e Leila, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos de turma Andréia, Anildo, Annelise, Cristiano, Fernando, Ivanise, Marcelo e Rusiene, pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Química pelo apoio, colaboração e valiosa convivência a qual muito contribuiu para minha formação.

A Capes e Cnpq, pelo suporte financeiro.

Aos inúmeros amigos aqui não mencionados que muito contribuíram, de uma maneira ou outra, para realização deste trabalho.



# SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK.....	1
1.2 DIABETES MELLITUS.....	4
1.3 A QUÍMICA BIOINORGÂNICA DO VANÁDIO.....	8
1.3.1 Ocorrência.....	8
1.3.2 Propriedades químicas.....	10
1.3.3 Aplicações biológicas.....	12
1.4 OBJETIVOS.....	14
1.4.1 Objetivo geral.....	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
<b>2 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>15</b>
2.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK.....	15
2.1.1 Materiais.....	15
2.1.2 Métodos e instrumentação.....	15
2.1.2.1 Espectroscopia de infravermelho.....	15
2.1.2.2 Espectroscopia de massas.....	16
2.1.2.3 Ressonância magnética nuclear.....	16
2.1.3 Coleta e identificação da planta.....	16
2.1.4 Preparação do extrato bruto e das frações.....	17
2.1.5 Isolamento dos flavonóides das folhas e flores.....	18
2.1.6 Caracterização dos compostos isolados.....	21
2.2 ESTUDO DE EQUILÍBRIO QUÍMICO DO KAENFEROL-3,7-O-( $\alpha$ )-DIRAMNOSÍDEO-VO(IV).....	22
2.2.1 Materiais e métodos.....	22
2.2.1.1 Ligante.....	22
2.2.1.2 Reagentes.....	22
2.2.1.3 Solventes.....	23
2.2.1.4 Medidas de equilíbrio potenciométrico.....	23
2.2.1.5 Computação.....	25
2.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	25
2.3.1 Preparação da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> e do seu constituinte majoritário.....	25
2.3.2 Animais experimentais.....	25
2.3.3 Animais diabéticos induzidos com aloxana.....	26
2.3.4 Efeito agudo da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> e de seu constituinte majoritário em animais normais.....	26
2.3.5 Efeito agudo da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> e de seu constituinte majoritário em animais normais hiperglicêmicos.....	26
2.3.6 Efeito agudo da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> e de seu constituinte majoritário em animais diabéticos induzidos com aloxana.....	27

2.3.7 Efeito agudo da administração oral e intraperitoneal do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em animais diabéticos induzidos com aloxana .....	27
2.3.8 Coleta do sangue.....	27
2.3.9 Dados e análise estatística .....	28
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK ...	29
3.1.1 Identificação do kaenferol (1).....	29
3.1.2 Identificação dos flavonóides glicosilados 2-6.....	31
3.2 ESTUDO DE EQUILÍBRIO QUÍMICO DO KAENFEROL-3,7-O-( $\alpha$ )-DIRAMNOSÍDEO-VO(IV) .....	40
3.2.1 Medidas do equilíbrio potenciométrico do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) .....	40
3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	45
3.3.1 Avaliação da atividade hipoglicêmica da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	45
3.3.1.1 Efeito agudo da administração oral da fração <i>n</i> -butanólica em ratos normais.....	45
3.3.1.2 Efeito agudo da administração oral da fração <i>n</i> -butanólica em ratos diabéticos.....	48
3.3.1.3 Efeito agudo da fração <i>n</i> -butanólica na curva de tolerância à glicose.....	51
3.3.2 Avaliação da atividade hipoglicêmica do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo isolado da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	52
3.3.2.1 Efeito agudo da administração oral do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais .....	52
3.3.2.2 Efeito agudo da administração oral do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos diabéticos.....	55
3.3.2.3 Efeito agudo do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo na curva de tolerância à glicose.....	57
3.3.3 Avaliação da atividade hipoglicêmica do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) .....	58
3.3.3.1 Efeito agudo da administração oral do vanádio(IV) em ratos diabéticos.....	58
3.3.3.2 Efeito agudo da administração oral do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos.....	61
3.3.3.3 Efeito agudo da administração intraperitoneal do vanádio(IV) em ratos diabéticos....	63
3.3.3.4 Efeito agudo da administração intraperitoneal do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos.....	64
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK ...	67
4.2 ESTUDO DE EQUILÍBRIO QUÍMICO DO KAENFEROL-3,7-O-( $\alpha$ )-DIRAMNOSÍDEO-VO(IV) .....	67
4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	68
4.3.1 Efeito hipoglicêmico da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	68
4.3.2 Efeito hipoglicêmico do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo isolado da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	68
4.3.3 Efeito hipoglicêmico do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) .....	69
<b>5 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>7 ANEXO - COLEÇÃO DE ESPECTROS.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espécie vegetal <i>Bauhinia forficata</i> .....	1
Figura 2	Núcleo fundamental dos flavonóides .....	2
Figura 3	Esquema da rota biossintética dos flavonóides .....	3
Figura 4	Estruturas químicas dos sais de vanádio(IV e V).....	11
Figura 5	Geometrias de coordenação mais comuns dos compostos de vanádio(IV e V) .....	11
Figura 6	Sistema utilizado na titulação potenciométrica .....	24
Figura 7	Estrutura química do composto <b>1</b> (kaenferol) .....	30
Figura 8	Estrutura química do composto <b>2</b> (kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo) .....	33
Figura 9	Estrutura química do composto <b>3</b> (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo) e do composto <b>4</b> (quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo) .....	34
Figura 10	Estrutura química do composto <b>5</b> (kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1"-6")- ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo) e do composto <b>6</b> (quercetina-3-O-( $\alpha$ )- glicosídeo-(1"-6")-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo) .....	36
Figura 11	Curvas dos dados experimentais de equilíbrio potenciométrico para o sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e força iônica $\mu = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ (KCl) .....	40
Figura 12	Curvas de distribuição de espécies do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )- diramnosídeo-VO(IV) em função de $-\log[\text{H}^+]$ para uma solução contendo 0,05490 mmol kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e 0,02610 mmol de VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e força iônica $\mu = 0,100 \text{ mol.L}^{-1}$ (KCl).....	43
Figura 13	Estruturas propostas para as espécies $\text{VOL}_2$ e $\text{VOH}_1\text{L}$ , predominantes em pH fisiológico .....	44
Figura 14	Efeito agudo da administração oral das diferentes doses da fração <i>n</i> - butanólica das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> em ratos normais.....	47
Figura 15	Efeito agudo da administração oral das diferentes doses da fração <i>n</i> - butanólica de <i>Bauhinia forficata</i> em ratos diabéticos .....	50
Figura 16	Efeito da administração oral da dose 800 mg/Kg da fração <i>n</i> -butanólica de <i>Bauhinia forficata</i> na curva de tolerância à glicose .....	52
Figura 17	Efeito agudo da administração oral das diferentes doses do kaenferol-3,7-O- ( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais .....	54

Figura 18	Efeito agudo da administração oral do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos diabéticos .....	56
Figura 19	Efeito da administração oral da dose de 100 mg/Kg do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo na curva de tolerância à glicose .....	58
Figura 20	Efeito agudo da administração oral de 0,0607 mol.L <sup>-1</sup> (ou 0,0146 mmol) de vanádio(IV) em ratos diabéticos.....	60
Figura 21	Efeito agudo da administração oral da dose de 100 mg/Kg (0,0587 mol.L <sup>-1</sup> ou 0,0294 mmol) do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos .....	62
Figura 22	Efeito agudo da administração intraperitoneal de 0,0607 mol.L <sup>-1</sup> (ou 0,0146 mmol) de vanádio(IV) em ratos diabéticos .....	64
Figura 23	Efeito agudo da administração intraperitoneal da dose de 100 mg/Kg (0,0587 mol.L <sup>-1</sup> ou 0,0294 mmol) do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos.....	66
Figura 24	Esquema da hipótese do modo de ação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo como agente hipoglicêmico .....	69
Fluxograma 1	Preparação das frações solúveis da solução hidroalcoólica das folhas de <i>B. forficata</i> .....	17
Fluxograma 2	Preparação das frações solúveis da solução hidroalcoólica das flores de <i>B. forficata</i> .....	18
Fluxograma 3	Isolamento dos constituintes químicos presentes na fração solúvel em AcOEt das folhas de <i>B. forficata</i> .....	19
Fluxograma 4	Isolamento dos constituintes químicos presentes na fração solúvel em <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>B. forficata</i> .....	19
Fluxograma 5	Isolamento dos constituintes químicos presentes na fração solúvel em AcOEt das flores de <i>B. forficata</i> .....	20

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre os dois tipos de Diabetes .....	5
Tabela 2	Resumo dos efeitos da insulina sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas no fígado, músculo e tecido adiposo.....	7
Tabela 3	Distribuição do vanádio na natureza .....	10
Tabela 4	Complexos de vanádio com diferentes modos de coordenação que apresentam atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos .....	13
Tabela 5	Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do kaenferol ( <b>1</b> ) e dos glicosídeos <b>2</b> , <b>3</b> e <b>5</b> , registrados em DMSO- $\text{d}_6$ usando aparelho que opera a 600 MHz para hidrogênio e 150 MHz para carbono-13. Deslocamentos químicos em $\delta$ ( $\delta_{\text{H}}$ e $\delta_{\text{C}}$ ) e constantes de acoplamento ( $J$ , entre parênteses) em Hz .....	37
Tabela 6	Dados de interação heteronuclear spin-spin a longa distância ( $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$ ) de átomos de carbono e hidrogênio obtidos dos espectros HMBC de <b>2</b> e <b>5</b> .....	39
Tabela 7	Constantes de protonação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e suas constantes de ligação com íon metálico VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e $\mu = 0,100$ mol.L $^{-1}$ (KCl).....	42
Tabela 8	Efeito da aloxana no peso corporal e na glicemia após o terceiro dia da indução do Diabetes .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B. forficata</i>	<i>Bauhinia forficata</i>
Co-A	Acetilcoenzima A
DM	Diabetes Mellitus
OMS	Organização Mundial da Saúde
DMID	Diabetes mellitus insulino-dependente
DMNID	Diabetes mellitus não-insulino-dependente
Glut-4	Transportador de glicose sensível à insulina
V <sup>III</sup>	Vanádio de estado de oxidação +3
V <sup>IV</sup>	Vanádio de estado de oxidação +4
V <sup>V</sup>	Vanádio de estado de oxidação +5
VO(IV)	Vanádio(IV)
VO(mal) <sub>2</sub> ou BMOV	Complexo bis(maltonato)-oxovanádio(IV)
VO-SAD	Complexo (sarcosina-N-ditiocarbonato)-oxovanádio(IV)
VO(cysm) <sub>2</sub>	Complexo bis(cisteína-metil-éster)-oxovanádio(IV)
VO(tar) <sub>2</sub>	Complexo bis(tartarato)-oxovanádio(IV)
VO(sal) <sub>2</sub>	Complexo bis(salicialdeído)-oxovanádio(IV)
VO(ox) <sub>2</sub>	Complexo bis(oxalato)-oxovanádio(IV)
VO(opt) <sub>2</sub>	Complexo (1-oxi-2-piridinatiolato)-oxovanádio(IV)
VO(acac) <sub>2</sub>	Complexo bis(acetilacetato)-oxovanádio(IV)
VO(ka) <sub>2</sub>	Complexo bis(kojato)-oxovanádio(IV)
VO(pa) <sub>2</sub>	Complexo bis(picolinato)-oxovanádio(IV)
VO-PYD	Complexo (pirrolidina-N-ditiocarbamato)-oxovanádio(IV)
PF	Ponto de fusão
KBr	Brometo de potássio
EMIE	Espectrometria de Massas por Impacto Eletrônico a 70 eV
I.V.	Espectrometria no Infravermelho
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
DEPT	Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização θ = 135°: sinais de CH <sub>2</sub> em fase oposta aos de CH e CH <sub>3</sub>

DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
$\delta$	Deslocamento químico
$J$	Constante de acoplamento (Hz)
MHz	Mega Hertz
ppm	partes por milhão
HMBC	“ $^1\text{H}$ – Detected Heteronuclear Multiple Bond Connectivity”
HMQC	“ $^1\text{H}$ – Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
NOE	Espectroscopia de Overhauser
H <sub>2</sub> O	Água
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
AcOEt	Acetato de etila
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
Fr.	fração
CCF	Cromatografia em camada fina
SiO <sub>2</sub>	Sílica
E.M.P.	Erro padrão da média
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
Al	Aloxana
STZ	Streptozotocina

## RESUMO

A *Bauhinia forficata*, popularmente conhecida como “pata de vaca” é uma planta muito utilizada no tratamento do Diabetes. Porém, poucos estudos científicos comprovam a atividade hipoglicêmica e do ponto de vista fitoquímico apenas um trabalho é encontrado na literatura. Diante deste fato, este trabalho teve os seguintes objetivos: (1) isolar e identificar os compostos das folhas e flores desta planta; (2) avaliar a atividade hipoglicêmica da fração *n*-butanólica das folhas em ratos normais, normais hiperglicêmicos e diabéticos induzidos com aloxana durante um período agudo de tratamento; (3) avaliar a atividade hipoglicêmica do composto majoritário da fração *n*-butanólica no mesmo modelo citado anteriormente; (4) complexar o composto majoritário da fração *n*-butanólica com o íon metálico vanádio(IV) e avaliar sua atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos.

O estudo fitoquímico das folhas e flores da *B. forficata* resultou no isolamento e identificação de kaenferol, e de cinco flavonóides glicosilados contendo as agliconas kaenferol e quercetina. O fracionamento cromatográfico das frações acetato de etila e *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* levou ao isolamento dos seguintes compostos:  $\beta$ -sitosterol, kaenferol, kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo, quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo. O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila das flores resultou no isolamento de kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo.

Os ensaios biológicos realizados em ratos normais mostraram que apenas às doses de 500 e 600 mg/Kg da fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* apresentaram efeito hipoglicêmico. Porém, em ratos diabéticos todas as doses desta fração diminuíram a glicemia. A dose de 400 mg/Kg reduziu os níveis glicêmicos após 1 hora de tratamento. A dose de 600 mg/Kg apresentou efeito hipoglicêmico após 1 e 2 horas de tratamento e a dose de 800 mg/Kg diminuiu a glicemia durante todo o tempo estudado. O composto majoritário da fração *n*-butanólica identificado como kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo diminuiu a glicemia em ratos normais apenas com a dose mais alta (200 mg/Kg). No entanto, em ratos diabéticos todas as doses deste composto apresentaram efeito hipoglicêmico. A dose de 50 mg/Kg apresentou uma diminuição na glicemia após 1 e 2 horas de tratamento. As doses de 100 e 200 mg/Kg



apresentaram uma queda nos níveis glicêmicos durante todo o tempo estudado. Em ratos hiperglicêmicos nem a fração *n*-butanólica nem o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo inibiram a absorção da glicose no intestino.

Os estudos potenciométricos mostraram que o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo coordena-se com o íon metálico vanádio(IV). As espécies formadas são:  $\text{VOL}^+$ ,  $\text{VOL}_2$ ,  $\text{VOH}_{1\text{L}}$  e  $\text{VOH}_{1\text{L}}\text{L}_2$ , ocorrendo predominância das espécies  $\text{VOL}_2$ ,  $\text{VOH}_{1\text{L}}$  em pH fisiológico. Estudos preliminares da atividade hipoglicêmica do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) foram realizados em ratos diabéticos através da via oral e intraperitoneal. Das vias utilizadas para o tratamento, o complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) diminuiu significativamente a glicemia através da via intraperitoneal em todos os tempos estudados.

A partir do estudo fitoquímico da *B. forficata* conclui-se que esta espécie vegetal classifica-se do ponto de vista quimiotaxonômico pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados.

Os resultados obtidos dos ensaios biológicos demonstraram que a fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* possui compostos com potencial hipoglicêmico. O kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, composto majoritário desta fração, foi efetivo em diminuir a glicemia de ratos normais e diabéticos e não interferiu na absorção da glicose no intestino. Estes resultados sugerem que o provável mecanismo de ação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo se dá por estimular a captação de glicose pelos tecidos periféricos.

As espécies  $\text{VOL}_2$  e  $\text{VOH}_{1\text{L}}$ , predominantes em  $\text{p[H]}$  fisiológico, tiveram efeito hipoglicêmico quando administradas intraperitonealmente. Provavelmente a espécie ativa seja a  $\text{VOH}_{1\text{L}}$ , já que esta possui mais sítios de coordenação livre do que a espécie  $\text{VOL}_2$ . Porém, o complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) não potencializou o efeito do vanádio sozinho.

## ABSTRACT

The *Bauhinia forficata*, commonly known as “pata de vaca” (cow’s hoof), is a plant widely used in Diabetes treatments. However, few scientific studies have verified its hypoglycemic activity and from a phytochemical point of view only one piece of work is found in the literature. Considering this fact, the present study has the following objectives: (1) to isolate and to identify the plant’s leaf and flower compounds; (2) to evaluate the *n*-butanol fraction hypoglycemic activity of the leaves in normal, normal hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats during acute treatment; (3) to evaluate the hypoglycemic activity of the major compound of the *n*-butanol fraction in the same way as mentioned previously; (4) to complex the major compound of the *n*-butanol fraction with the metallic vanadium(IV) ion and to evaluate its hypoglycemic activity in alloxan-induced diabetic rats.

The phytochemical study of the *B. forficata* leaves and flowers resulted in the kaempferol isolation and identification as well as the isolation and identification of five glycosides flavonoids containing aglycones kaempferol and quercetin. The chromatographic separation of the ethyl acetate and *n*-butanol fractions of the *B. forficata* leaves led to the isolation of the following compounds:  $\beta$ -sitosterol, kaempferol, kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside, quercetin-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside, kaempferol-3-O-( $\alpha$ )-glucoside-(1'''-6'')-rhamnoside-7-O-( $\alpha$ )-rhamnoside, quercetin-3-O-( $\alpha$ )-glucoside-(1'''-6'')-rhamnoside-7-O-( $\alpha$ )-rhamnoside. The chromatographic separation of the ethyl acetate fraction of the flowers resulted in the isolation of kaempferol-7-O-( $\alpha$ )-rhamnoside.

The biological tests carried out on normal rats showed that only the 500 and 600 mg/Kg doses of the *n*-butanol fraction of the *B. forficata* leaves presented hypoglycemic effect. However, in alloxan-induced diabetic rats, all of the *n*-butanol fraction doses decreased the blood glucose levels. The 400 mg/Kg dose reduced the blood glucose levels after 1 hour of treatment. The 600 mg/Kg dose presented hypoglycemic effect after 1 and 2 hours of treatment and the 800 mg/Kg dose decreased the glycemic during the whole studied period. The major compound of the *n*-butanol fraction identified as kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside, reduced blood glucose levels in normal rats only with the highest dose (200 mg/Kg). However, in alloxan-induced diabetic rats all the doses of this compound presented hypoglycemic effect. The 50 mg/Kg dose presented a fall on blood glucose levels after 1 and 2 hours of treatment. The 100 and 200 mg/Kg doses showed a significant reduction in blood

glucose levels during the whole studied time. In hyperglycemic rats neither the *n*-butanol fraction nor the kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside inhibited the glucose absorption in the intestine.

The potentiometric studies showed that the kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside is coordinated with the metallic vanadium(IV) ion. The species formed are:  $\text{VOL}^+$ ,  $\text{VOL}_2$ ,  $\text{VOH-}_1\text{L}$  and  $\text{VOH-}_1\text{L}_2$ , with the  $\text{VOL}_2$  and the  $\text{VOH-}_1\text{L}$  species predominating at physiological pH. Preliminary studies on the hypoglycemic activity of the kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside-VO(IV) complex were carried out in alloxan-induced diabetic rats orally and intraperitoneally. From the ways used for the treatment, the kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside-VO(IV) complex significantly decreased the blood glucose levels when administrated intraperitoneally during the whole studied period.

Hence, from the *B. forficata* phytochemical study it can be inferred that this plant species is quimiotaxonomically classified because of free flavonoid and glycoside accumulation.

The results obtained from the biological tests demonstrated that the *n*-butanol fraction of the *B. forficata* leaves possesses compounds with hypoglycemic potential. The kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside, the major compound of the fraction, was effective in decreasing the blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats and did not inhibit the glucose absorption in the intestine. These results suggest that the probable mode of action of the kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside like hypoglycemic agent is due to the stimulation of the glucose uptake by peripheral tissues.

The  $\text{VOL}_2$  and  $\text{VOH-}_1\text{L}$  species, predominant at physiological pH, had hypoglycemic effect when administered intraperitoneally. It is most probably that the active species is  $\text{VOH-}_1\text{L}$ , since it possesses more vacant coordination sites than the  $\text{VOL}_2$  species. However, the kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside-VO(IV) complex did not improve the hypoglycemic effect of the vanadium itself.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies<sup>1</sup>. Algumas espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul<sup>2</sup>.

A *Bauhinia forficata* Link, conhecida popularmente como “pata de vaca”, é uma árvore de médio porte (5 a 9 metros) cujas folhas são bipartidas lembrando a pata de uma vaca, tem flores de coloração branca e frutos do tipo vagem linear, é encontrada principalmente nas regiões do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, e destaca-se por apresentar propriedades hipoglicêmica, diurética e depurativa<sup>3-4</sup> (Figura 1).



Figura 1: Espécie vegetal *Bauhinia forficata*.

O gênero *Bauhinia* pode ser classificado do ponto de vista quimiotaxonômico pelo acúmulo de lactonas, triterpenos, terpenóides, flavonóides, esteróides, taninos e quinonas<sup>1</sup>. Porém, a espécie vegetal *Bauhinia forficata* é caracterizada quimicamente pela presença de flavonóides e fitoesteróis. Segundo Silva e colaboradores (2000) o estudo fitoquímico das folhas desta planta resultou no isolamento e identificação de um flavonóide glicosilado (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo) e de um fitoesterol ( $\beta$ -sitosterol)<sup>5</sup>.

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ). A Figura 2 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e a numeração dos átomos de carbono com a denominação de cada anel<sup>6</sup>.

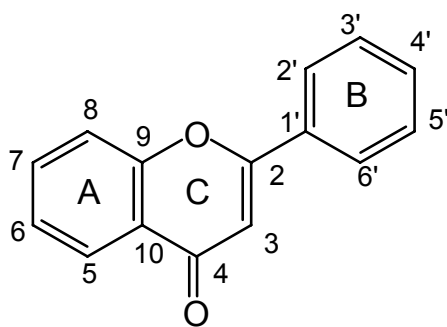


Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonóides.

De um modo geral, estes compostos diferem entre si pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B e C, além da presença ou não da dupla ligação e da carbonila no anel C. Além disso, podem ser encontrados derivados glicosilados, metilados, acetilados ou sulfatados<sup>6</sup>.

Os flavonóides são formados a partir de duas rotas biossintéticas distintas: a do ácido chiquímico o qual originará a fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico e a do acetato, via ácido malônico. Então a rota biossintética dos flavonóides se dá a partir de três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de cinamoil-CoA. Este último é responsável pela formação do anel B e pela ponte de três carbonos. E o malonil-CoA é responsável pelo anel A da flavanona<sup>6</sup> (Figura 3).

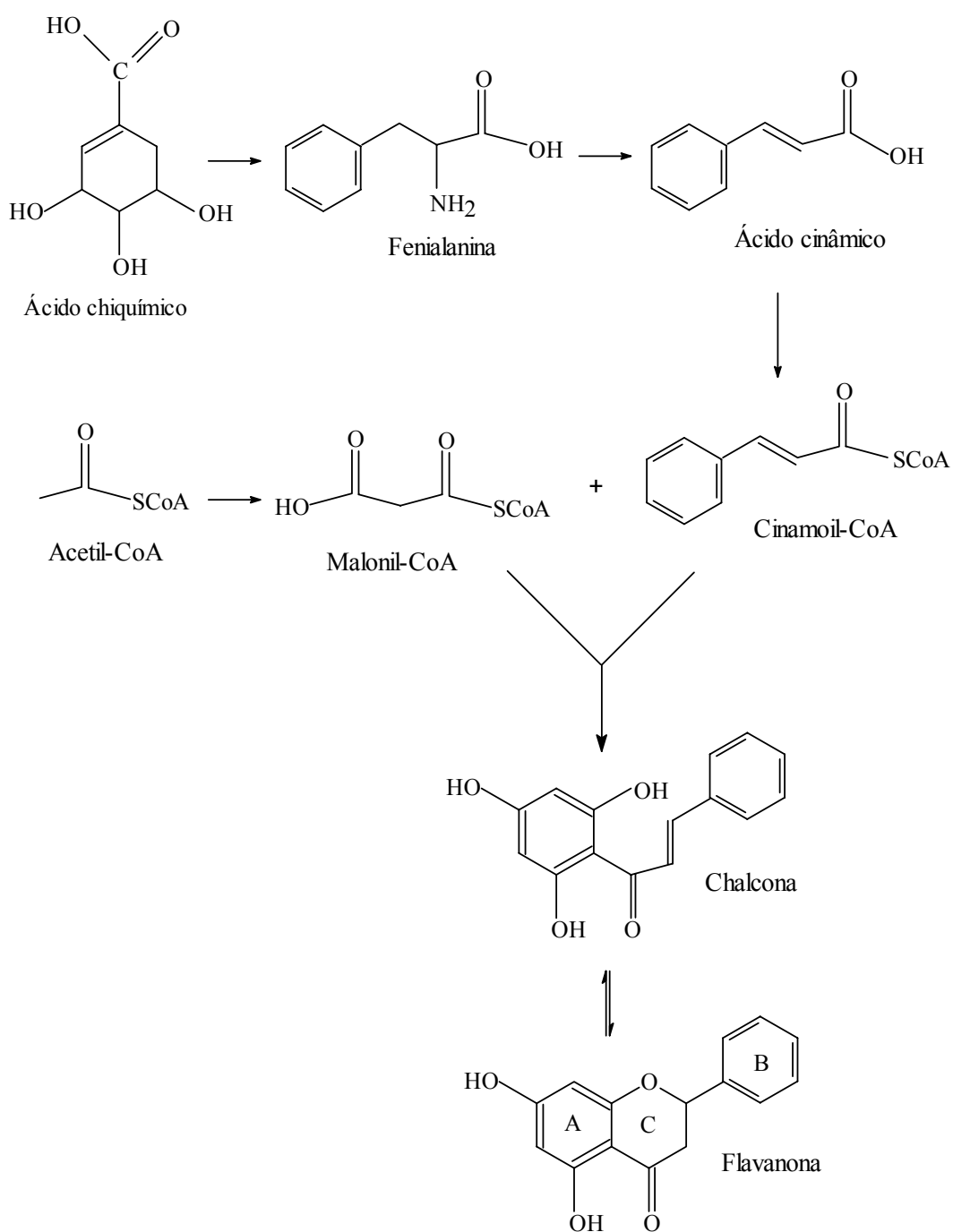


Figura 3: Esquema da rota biossintética dos flavonóides.

Na literatura esta classe de compostos apresenta importantes propriedades farmacológicas<sup>6</sup>, tais como: anticarcinogênico, antiinflamatório, antiviral, antidiabético, antioxidante<sup>7</sup>, entre outras. Entretanto a atividade hipoglicêmica dos flavonóides é pouco conhecida.

Os primeiros relatos da atividade hipoglicêmica de *Bauhinia forficata* em pacientes diabéticos foram feitos por Carmela Juliani em 1929 e 1931<sup>8-9</sup>. Uma década mais tarde, Juliani demonstrou que esta espécie vegetal continha compostos capazes de diminuir a glicemia de cães e coelhos submetidos à hiperglicemia adrenalítica e pancreatômizados<sup>10</sup>. Porém, poucos relatos da atividade hipoglicêmica desta planta são atualmente encontrados na literatura, e desses relatos alguns são contraditórios<sup>11-12</sup> ou não apresentaram efeito hipoglicêmico<sup>13</sup>. Caricati-Neto e colaboradores (1985) observaram mudanças significativas na glicemia quando a fração aquosa das folhas de *B. forficata* foi administrada intraperitonealmente em ratos diabéticos<sup>11</sup>. Mais recentemente, Pepato e colaboradores (2002), verificaram que durante um tratamento crônico (31 dias) o grupo diabético tratado com chá das folhas de *B. forficata* mostrou significativa redução na glicemia, nos níveis de glicose na urina e uréia na urina em relação ao grupo diabético controle<sup>14</sup>. Apenas Russo e colaboradores (1990) não encontraram diferença significativa nos níveis de glicose e de insulina entre os grupos de pacientes diabéticos do tipo 2 que receberam o placebo (*Imperata brasiliensis*, “sapé”) e o chá das folhas de *B. forficata* durante um tratamento agudo (0 a 6 horas) e crônico (1 a 56 dias)<sup>12</sup>. Desta forma, é de grande importância que investigações mais detalhadas usando modelos experimentais apropriados sejam realizados para melhor esclarecer a atividade hipoglicêmica desta espécie vegetal.

## 1.2 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é o nome dado a um grupo de desordens com diferentes etiologias. Esta é caracterizada pelo distúrbio no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios causada pela completa ou relativa insuficiência da secreção e/ou ação da insulina. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a DM é geralmente classificada como Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (DMID) e Diabetes Mellitus Não-Insulino-Dependente (DMNID) (Tabela 1)<sup>15</sup>.

Tabela 1: Comparação entre os dois tipos de Diabetes.

	<b>Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (DMID)</b>	<b>Diabetes Mellitus Não-Insulino-Dependente (DMNID)</b>
<b>Sinônimo</b>	Tipo 1 ou início juvenil	Tipo 2 ou início adulto
<b>Idade de início</b>	Usualmente na infância ou puberdade	Freqüentemente acima de 40 anos
<b>Tipo físico</b>	Magro	Obeso
<b>Prevalência</b>	10-20% dos diabetes diagnosticados	80-90% dos diabetes diagnosticados
<b>Insulina plasmática</b>	Baixa a ausente	Normal a elevada
<b>Defeito ou deficiência</b>	Células $\beta$ destruídas	Incapacidade das células $\beta$ em produzir quantidades apropriadas de insulina;  Resistência à insulina
<b>Complicações agudas</b>	Cetoacidose	Coma hiperosmolar
<b>Cetose</b>	Comum	Rara
<b>Tratamento com insulina</b>	Sempre necessário	Usualmente não requerido
<b>Hipoglicemiantes orais</b>	Não responsivo	Responsivo

O Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (DMID) ou tipo 1 caracteriza-se pela ausência da secreção de insulina por destruição total ou parcial das células  $\beta$  do pâncreas. O tratamento consiste principalmente no uso diário de injeções de insulina e as possíveis complicações decorrentes da insulino-terapia compreendem hipoglicemia, lipodistrofia, alergia local ou sistêmica e infecção nos locais de aplicação<sup>16-18</sup>.



A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas. É composta por 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias polipeptídicas, designadas A e B, as quais estão ligadas por pontes dissulfeto (conectando os aminoácidos A7 ao B7 e A20 ao B19). Uma terceira ponte dissulfeto na cadeia A liga os resíduos A6 e A11. Sua principal função é controlar o metabolismo intermediário, exercendo ações sobre o fígado, músculo e tecido adiposo. O efeito global da insulina consiste em conservar os combustíveis energéticos ao facilitar a captação, utilização e o armazenamento da glicose, dos lipídios e das proteínas<sup>16-18</sup>.

Os efeitos metabólicos da insulina podem ser observados no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. No metabolismo dos carboidratos os efeitos da insulina são mais evidentes em três tecidos: fígado, músculo e tecido adiposo. No fígado, a insulina diminui a produção de glicose por inibir a gliconeogênese, diminui a degradação do glicogênio (glicogenólise) e estimula a síntese de glicogênio. No músculo, a insulina aumenta a síntese de glicogênio, aumenta a glicólise e aumenta a captação de glicose por aumentar o número de transportadores de glicose (Glut-4) na membrana plasmática. No tecido adiposo, a insulina aumenta a captação de glicose semelhante ao músculo. Assim, a administração intravenosa de insulina causa diminuição imediata na concentração da glicose no sangue. No metabolismo dos lipídios a insulina aumenta a síntese de ácidos graxos e a formação de triglicerídeos no tecido adiposo, enquanto inibe a lipólise, em parte através da desfosforilação (e, portanto, inativação) das lipases e, também provoca lipogênese no fígado. No metabolismo das proteínas a insulina estimula a entrada de aminoácidos nas células e aumenta a síntese de proteínas, na maioria dos tecidos (Tabela 2)<sup>16-18</sup>.

Tabela 2: Resumo dos efeitos da insulina sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas no fígado, músculo e tecido adiposo.

<b>Tipo de metabolismo</b>	<b>Células hepáticas</b>	<b>Tecido adiposo</b>	<b>Músculo</b>
Metabolismo de carboidratos	↓ gliconeogênese	↑ captação de glicose	↑ captação de glicose
	↓ glicogenólise	↑ síntese de glicerol	↑ glicólise
	↑ glicólise		↑ glicogênese
	↑ glicogênese		
Metabolismo de lipídios	↑ lipogênese	↑ síntese de triglicerídeos	-----
	↓ lipólise	↑ síntese de ácidos graxos	
Metabolismo de proteínas	↓ degradação das proteínas	-----	↑ captação de aminoácidos
			↑ síntese de proteínas

Onde ↑ significa aumento e ↓ significa diminuição.

No Diabetes Mellitus Não-Insulino-Dependente (DMNID) ou tipo 2 existem no mínimo dois defeitos fundamentais: o primeiro é a diminuição na habilidade dos tecidos periféricos em responder a insulina (o que é denominado resistência à insulina) e o segundo é a deficiência funcional das células  $\beta$  do pâncreas em secretar insulina, o que resulta numa hiperglicemia duradoura. O tratamento é baseado em medidas dietéticas, exercícios, agentes hipoglicemiantes orais e quando necessário doses moderadas de insulina.

Os principais grupos de agentes hipoglicemiantes orais que reduzem a glicemia são as sulfoniluréias, as biguanidas e os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase. As sulfoniluréias exercem a principal ação sobre as células  $\beta$  estimulando a secreção de insulina e reduzindo assim a concentração plasmática de glicose. Mas para exercerem esta função exigem a presença de

células  $\beta$  funcionais. É indicado para pacientes magros que possuem deficiência de insulina em maior grau. Seus efeitos colaterais são: hipoglicemia e ganho de peso corporal. Os principais fármacos encontrados no mercado são: tolbutamida, glibenclamida, clorpropamida e outros. O grupo das biguanidas não necessita das células  $\beta$  funcionais. Sua ação é complexa e ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se que elas aumentam a sensibilidade à insulina, reduzem a absorção intestinal de glicose, diminuem a gliconeogênese e aumentam a captação de glicose pelos tecidos periféricos. O principal efeito indesejável consiste em distúrbio gastrointestinal transitório. Exemplo: metformina. Os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase intestinal atuam no retardamento da absorção de carboidratos, reduzindo o aumento pós-prandial da glicemia. Os efeitos colaterais mais comuns são flatulência, fezes moles, diarreias, dores e distensões abdominais. Exemplo acarbose. Tanto as biguanidas e como os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase intestinal são indicados para pacientes com diabetes do tipo 2 que são obesos e não respondem ao tratamento apenas com a dieta <sup>16-18</sup>.

Sendo assim, a busca e o desenvolvimento de compostos oralmente ativos que imitam ou aumentam as propriedades da insulina é uma tarefa urgente. Estes compostos orais poderiam substituir as dolorosas injeções de insulina no diabetes do tipo 1 e diminuir os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais no diabetes do tipo 2.

### 1.3 A química bioinorgânica do vanádio

O vanádio foi inequivocamente descoberto em 1830, pelo químico sueco Nils Gabriel Sefström, num minério de ferro da região de Taberg, Suécia, em colaboração com o químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Sefström deu-lhe o nome de vanádio, em homenagem a “Vanadis”, deusa escandinava da beleza e da juventude, devido às cores variadas e brilhantes dos seus compostos <sup>19-21</sup>.

#### 1.3.1 Ocorrência

Na natureza o elemento químico vanádio é encontrado com relativa abundância (aproximadamente 0,02%). Nos oceanos a concentração desse elemento é de apenas 50 nM,

porém alguns animais marinhos podem acumulá-lo. Estes animais marinhos são denominados de Tunicados, a espécie Ascídea é capaz de acumular cerca de 0,15 M de vanádio em suas células especializadas do sangue. A habilidade de acumular vanádio não é restrita somente a animais marinhos. Um organismo terrestre denominado *Amanita muscaria* (cogumelo venenoso) é capaz de armazenar grandes quantidades de vanádio. A partir deste fungo foi isolado a “amavadina”, um composto de vanádio de baixo peso molecular<sup>22</sup>.

Hoje, são conhecidas duas enzimas nas quais o vanádio está presente no sítio ativo: as haloperoxidases que são encontradas em algas marinhas marrons (*Ascophillum nodosum*, *Laminaria sacharina*) e tem como função catalisar a halogenação de compostos orgânicos pelos haletos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as nitrogenases que são encontradas em bactérias fixadoras de nitrogênio (*Azobacter chroococcum* e *Azobacter vinelandii*) e tem como função catalisar a reação que reduz o nitrogênio à amônia, sendo que as nitrogenases incorporam vanádio quando há falta de molibidênio<sup>23-24</sup>.

O vanádio está presente em uma variedade de alimentos que comumente ingerimos. Fontes ricas de vanádio incluem gelatina, leite em pó desnatado, lentilhas secadas, lagosta, ervilha verde, rabanetes, repolho, aveias, batata, abóbora, alface, óleos vegetais principalmente óleo de soja, oliva, milho. Em menor proporção, o vanádio também pode ser encontrado em frutas frescas, carnes, frutos do mar, e em produtos lácteos<sup>25</sup>.

Em mamíferos, o vanádio está presente como um elemento traço e embora vários estudos sugiram que ele seja essencial, pelo menos no desenvolvimento e no crescimento de aves e ratos, a função biológica em mamíferos ainda é pouco conhecida<sup>20</sup>. Em humanos, não se sabe se o vanádio é uma exigência essencial, porém a entrada dietética varia entre 10-60 µg/dia, a concentração no plasma é aproximadamente de 20 nM e no organismo é em torno de 100-200 µg<sup>26</sup> (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição do vanádio na natureza.

Amostra	Concentração
Plantas	0,1-5 mg/Kg
Água do mar (Oceano Pacífico)	1,6 µg/L
Água potável	1,3 µg/L
Carbono (contendo sedimentos de origem marinha, exemplo xisto, calcário)	Acima de 100 mg/Kg
Petróleo bruto e carvão	Acima de 1g/Kg
Ascídea	Acima de 2g/Kg
Leite de vaca	0,2-10 µg/L
<i>Amanita muscaria</i>	Acima de 1g/Kg
Algas marinhas	2 mg/Kg
Invertebrados	0,5-2,5 mg/Kg

### 1.3.2. Propriedades químicas

O vanádio é um elemento da primeira série de transição, de número atômico 23 e peso molecular 50,94 e apresenta uma química extremamente complexa. Ele exibe estados de oxidação +2, +3, +4 e +5, sendo que os mais estáveis são os estados +4 e +5. Nos sistemas biológicos, as formas mais comuns são +3, +4 e +5 e encontra-se ligado a grupos como -SH, -SS-, -OH, -N-, COO- e  $\text{PO}_4^{3-}$ . O vanádio de estado de oxidação +3 ( $\text{V}^{\text{III}}$ ) é um forte redutor em pH neutro. No meio extracelular, o vanádio aparece no estado de oxidação +5 ( $\text{V}^{\text{V}}$ ) (forma aniônica) e assemelha-se ao fosfato, isto é metavanadato ( $\text{VO}_3^-$ ) ou ortovanadato ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ), e no meio intracelular, o vanádio aparece no estado de oxidação +4 ( $\text{V}^{\text{IV}}$ ) (forma catiônica) e se assemelha ao íon  $\text{Mg}^{+2}$  (Figura 4)<sup>26</sup>.

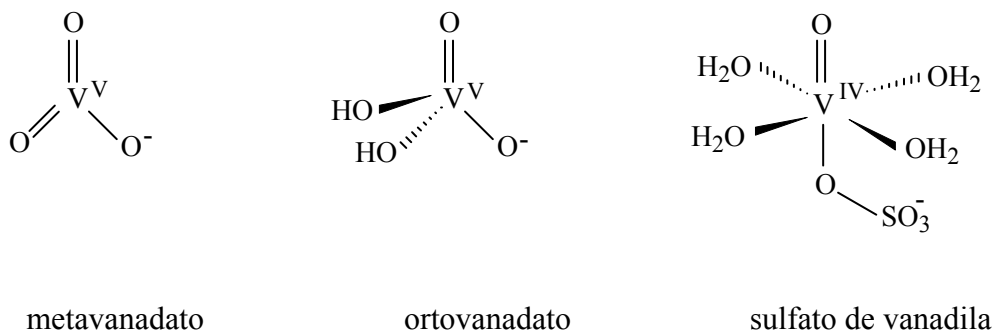


Figura 4: Estruturas químicas dos sais de vanádio(IV e V).

Os compostos de coordenação de vanádio apresentam comumente geometria octaédrica, pirâmide de base quadrada e bipirâmide trigonal (Figura 5), com um átomo de oxigênio que forma dupla ligação com o cátion V<sup>IV</sup> ou V<sup>V</sup>. Este oxigênio se conhece como “oxo” e os compostos são denominados de oxovanadilo e oxovanadato dependendo do estado de oxidação<sup>23</sup>.

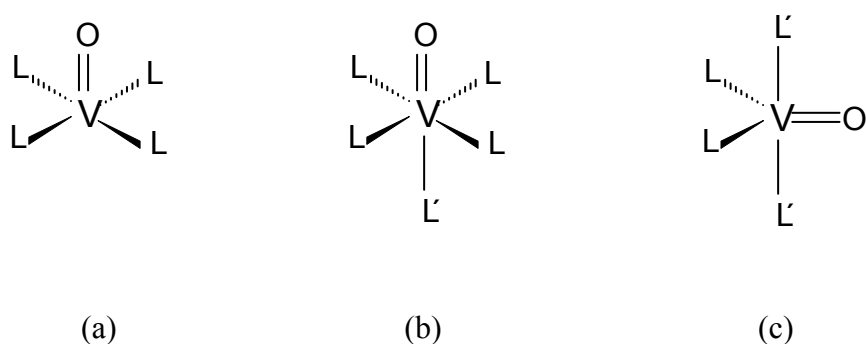


Figura 5: Geometrias de coordenação mais comuns dos compostos de vanádio(IV e V). (a) pirâmide de base quadrada; (b) octaedro distorcido tetragonalmente; (c) bipirâmide trigonal. L e L' são ligantes diferentes.

### 1.3.3 Aplicações biológicas

O vanádio apresenta importantes propriedades terapêuticas. Como por exemplo, ele pode ser usado no tratamento do diabetes, câncer, aterosclerose, anemia, metabolismo de lipídios, prevenção de cáries, sífilis e tuberculose<sup>21, 27</sup>. Porém, sua função biológica de maior destaque é a de mimetizar a insulina.

Durante os últimos 20 anos, evidências consideráveis mostram que o vanadil ( $\text{VO}^{2+}$ , estado de oxidação +4) e o vanadato ( $\text{VO}_3^-$ , estado de oxidação +5) simulam os efeitos biológicos da insulina em vários tipos de células. Estudos *in vitro* mostram que o vanádio promove o aumento na entrada de glicose; estimula a síntese de glicogênio no fígado, no diafragma e em células adiposas; inibe a gliconeogênese em hepatócitos<sup>28</sup>; aumenta os transportadores de glicose e a oxidação da mesma nos adipócitos e músculo esquelético<sup>29-31</sup>; inibe a lipólise<sup>32</sup> e ativa a lipogênese nos adipócitos<sup>33</sup>. Portanto, o mecanismo de ação do vanádio *in vitro* está bem documentado.

Apoiado nestas observações Heyliger e colaboradores (1985) demonstraram pela primeira vez que o vanadato era capaz de diminuir a glicemia de ratos diabéticos<sup>34</sup>. Depois disto, vários outros estudos realizados *in vivo* mostraram que o vanádio, tanto o vanadato como o vanadil, apresenta atividade hipoglicêmica nos dois modelos de Diabetes: tipo 1 e tipo 2. Segundo, Tsuji e colaboradores (1996) quando o sulfato de vanadila é administrado intraperitonealmente por seis dias em ratos diabéticos induzidos com streptozotocina os níveis de glicose no sangue atingem os níveis do controle<sup>35</sup>. Thompson e colaboradores (1993) também mostraram que o sulfato de vanadila dado na água de beber por doze semanas diminui a glicemia de ratos diabéticos<sup>36</sup>.

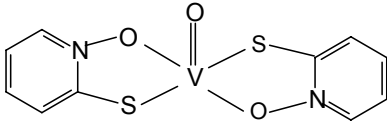
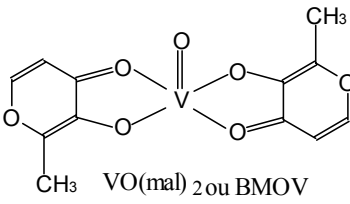
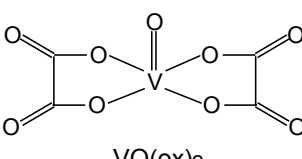
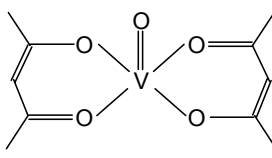
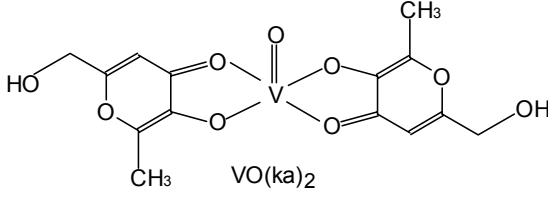
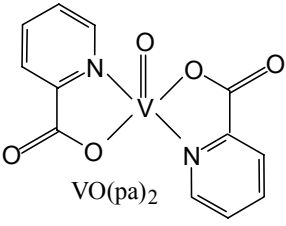
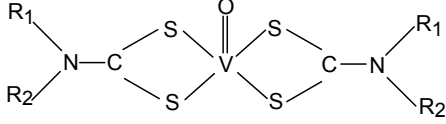
Entretanto, com a intenção de potencializar a atividade hipoglicêmica dos sais de vanádio, vários autores complexam estes sais com diferentes ligantes orgânicos tais como maltolato<sup>37-39</sup>, picolinato<sup>40-41</sup>, ditiocarbonato<sup>42</sup>, ácido quínico<sup>27</sup>, entre outros.

Segundo Willsky e colaboradores (2001) quando o complexo bismaltolato oxovanádio ( $\text{VO}(\text{mal})_2$ ) e o sulfato de vanadila foram administrados intraperitonealmente durante um tratamento agudo, apenas o complexo apresentou uma redução na glicemia de ratos diabéticos<sup>38</sup>. Estudos feitos por Sakurai e colaboradores (1998) demonstraram que o

complexo ditiocarbonato-vanadil (VO-SAD) reduziu a glicemia de ratos diabéticos quando administrado pelas vias intraperitoneal e oral<sup>42</sup>.

Com base na literatura foi proposta uma escala crescente dos complexos de vanádio que apresentam efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos  $\text{VO}(\text{mal})_2 > \text{VO}(\text{cysm})_2 > \text{VO}(\text{tar})_2 > \text{VO}(\text{sal})_2 > \text{VO}(\text{ox})_2$ <sup>43</sup>. Através dela é possível notar que o modo de coordenação do vanádio influencia na atividade (Tabela 4).

Tabela 4: Complexos de vanádio com diferentes modos de coordenação que apresentam atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos.

Modo de	Complexo
$\text{S}_2\text{O}_2$	 VO(opt) <sub>2</sub>
$\text{O}_4$	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>   VO(mal)<sub>2</sub> ou BMOV         </div> <div>   VO(ox)<sub>2</sub> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div>   VO(acac)<sub>2</sub> </div> <div>   VO(ka)<sub>2</sub> </div> </div>
$\text{N}_2\text{O}_2$	 VO(pa) <sub>2</sub>
$\text{S}_4$	 VO-PYD: R <sub>1</sub> = —CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> — VO-SAD: R <sub>1</sub> = —CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = —CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>



## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade hipoglicêmica da espécie vegetal *Bauhinia forficata*.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

Estudar o efeito dose-resposta da fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* na glicemia de ratos normais, normais hiperglicêmicos e diabéticos induzidos com aloxana após tratamento agudo com esta fração;

Isolar e identificar o(s) composto(s) da fração *n*-butanólica das folhas e flores de *B. forficata*;

Estudar o efeito dose-resposta do composto majoritário da fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* na glicemia de ratos normais, normais hiperglicêmicos e diabéticos induzidos com aloxana após tratamento agudo com este composto;

Caracterizar o equilíbrio químico do composto majoritário da fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* com o íon metálico vanádio(IV);

Estudar o efeito hipoglicêmico do composto majoritário da fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* complexado com o vanádio(IV) em ratos diabéticos induzidos com aloxana após tratamento agudo do complexo pelas vias oral e intraperitoneal.

## **2 PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA* LINK**

#### **2.1.1 Materiais**

Os solventes foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação. As misturas de solventes foram feitas a volume por volume (v/v).

Nos fracionamentos e separações cromatográficas foi usado gel de sílica como adsorvente. Na cromatografia em coluna foi usado gel de sílica do tipo Merck e/ou Riedel de granulometria 0,063-0,2 mm. Para cromatografia em camada fina foram usadas cromatofolhas de alumínio revestidas com gel de sílica 60 de 0,2 mm de espessura da marca Merck.

Os pontos de fusão (PF) foram determinados em um aparelho da Microquímica APF-301 e não sofreram correções.

O critério de pureza adotado foi: obtenção de uma única mancha na cromatografia de camada fina analítica usando-se diferentes sistemas de solventes e reveladores.

#### **2.1.2 Métodos e instrumentação**

##### **2.1.2.1 Espectroscopia de infravermelho**

Os espectros de infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr grau espectroscópico, com leituras na região de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  em um espectrômetro Perkin Elmer FT 16PC, na Central de Análises do Departamento de Química-UFSC.

### 2.1.2.2 Espectroscopia de massas

Os espectros de massas foram obtidos por inserção direta (prob) em um espectrômetro Shimadzu CG-MS-QP-2000, com ionização sob impacto a 70 eV.

### 2.1.2.3 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos a 600 MHz em aparelho Bruker DRX 600. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais  $\delta$  (ppm), usando-se tetrametilsilano como referencial interno e DMSO- $d_6$  como solvente. As áreas relativas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s (singlete), d (duplete), t (triplete), m (multiplete).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos a 150 MHz em aparelho Bruker DRX 600, utilizando tetrametilsilano como referencial interno e DMSO- $d_6$  como solvente, e com os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais  $\delta$  (ppm).

Os espectros DEPT-90 foram obtidos a 50,0 MHz nos equipamentos indicados anteriormente.

Os espectros bidimensionais HMBC, HMQC e HSQC e os experimentos de NOE foram obtidos a 600 MHz em aparelho Bruker.

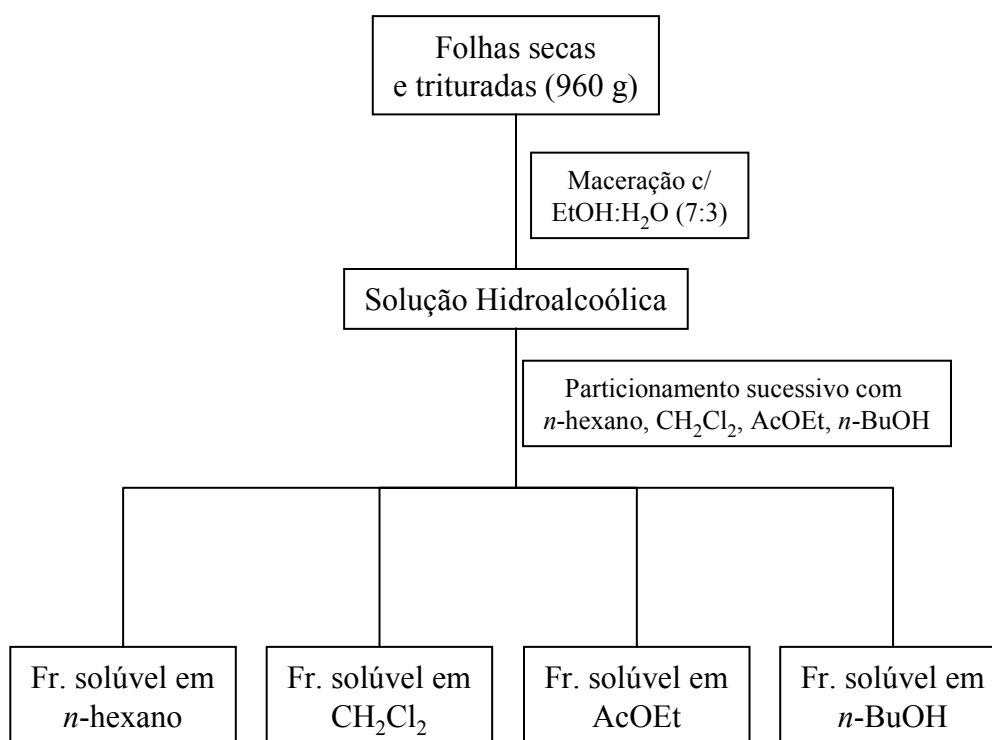
### 2.1.3 Coleta e identificação da planta

As folhas e flores da espécie vegetal *Bauhinia forficata* foram coletadas em novembro de 1998 na cidade de Orleans no sul do estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pelo Professor Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da UFSC, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob o número FLOR-31271.

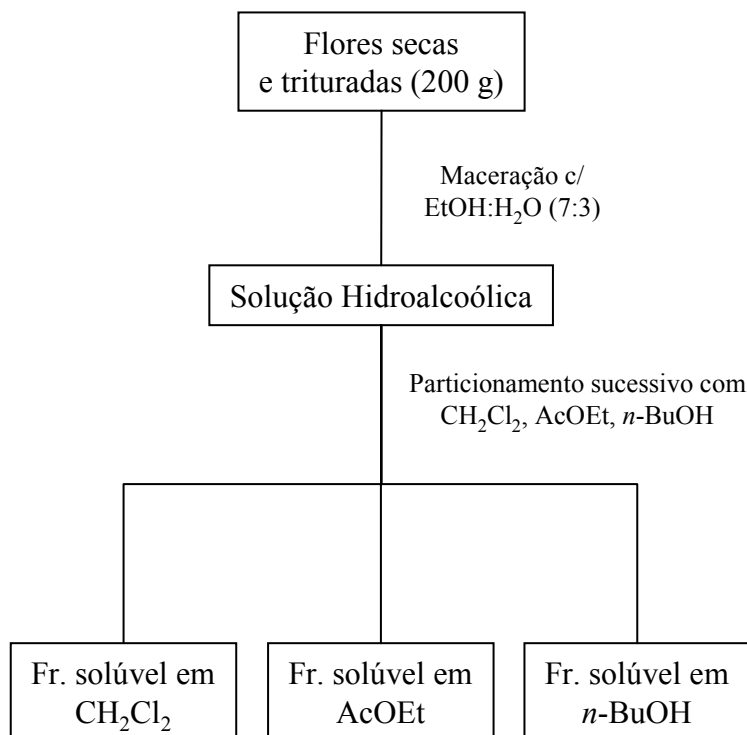
### 2.1.4 Preparação do extrato bruto e das frações

As folhas (960 g) e flores (200 g) secas e trituradas foram extraídas separadamente por maceração exaustiva com EtOH/H<sub>2</sub>O (7:3) à temperatura ambiente. Os extratos hidroalcoólicos foram evaporados em rotavapor sob pressão reduzida a 50 °C até ¼ de seus volumes iniciais e mantidos em repouso por dois dias a 4 °C. Em seguida estas soluções foram filtradas em papel filtro e os filtrados foram submetidos a um particionamento sucessivo com *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, e *n*-BuOH. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para a obtenção das respectivas frações dos extratos das folhas e flores (Fluxograma 1 e 2, respectivamente).

#### Fluxograma 1



Fluxograma 1: Preparação das frações solúveis da solução hidroalcoólica das folhas de *B. forficata*.

**Fluxograma 2**

Fluxograma 2: Preparação das frações solúveis da solução hidroalcoólica das flores de *B. forficata*.

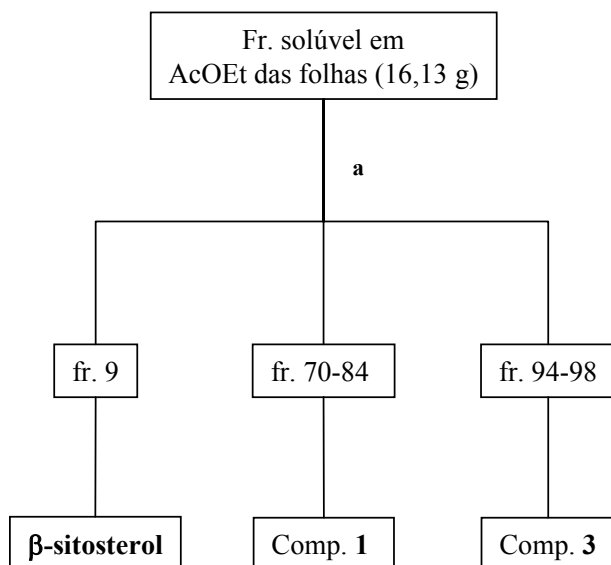
**2.1.5 Isolamento dos flavonóides das folhas e flores**

A fração AcOEt das folhas (16,13 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) de sílica Gel usando como eluente o sistema *n*-hexano/AcOEt/MeOH com polaridade crescente. Foram recolhidas 115 frações de 100 mL e reunidas de acordo com a análise em CCF. A fração 9 foi recristalizada em metanol e forneceu 10 mg de  $\beta$ -sitosterol; as frações 70-84 e 94-98 forneceram kaenferol (**1**) (20 mg) e kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**3**) (83 mg), respectivamente, após recristalizações em AcOEt (Fluxograma 3).

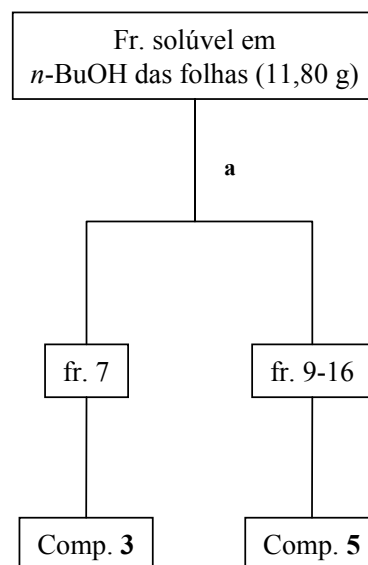
A fração *n*-BuOH das folhas (11,8 g) foi submetida ao mesmo procedimento descrito acima, recolhendo-se 25 frações de 100 mL. A fração 7 foi recristalizada em metanol e forneceu 300 mg de kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**3**); as frações 9-16 com base na

análise por CCF, forneceram kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**5**) (25 mg) após recristalização em AcOEt (Fluxograma 4).

### Fluxograma 3



### Fluxograma 4

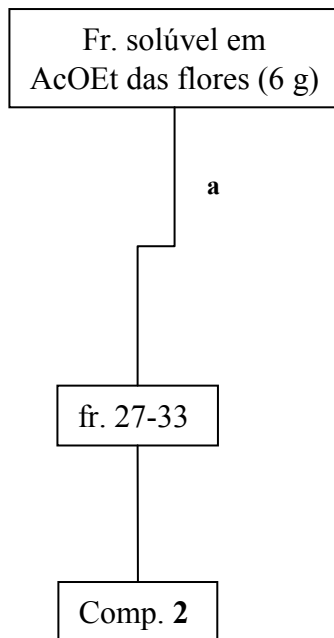


Fluxograma 3: Isolamentos dos constituintes químicos presentes na fração solúvel em AcOEt das folhas de *B. forficata*. **a**: cromatografia em coluna de SiO<sub>2</sub> usando-se como eluente o sistema n-hexano/AcOEt/MeOH com polaridade crescente.

Fluxograma 4: Isolamentos dos constituintes químicos presentes na fração solúvel em n-BuOH das folhas de *B. forficata*. **a**: cromatografia em coluna de SiO<sub>2</sub> usando-se como eluente o sistema n-hexano/AcOEt/MeOH com polaridade crescente.

A fração AcOEt das flores (6 g) também foi fracionada em CC de sílica, usando-se o mesmo procedimento aplicado para as frações descritas acima. Foram coletadas 54 frações de 100 mL e as frações 27-33 reunidas com base na análise por CCF, após sucessivas recristalizações com AcOEt forneceram kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**2**) (8,5 mg) (Fluxograma 5).

### Fluxograma 5



Fluxograma 5: Isolamentos dos constituintes químicos presentes na fração solúvel em AcOEt das flores de *B. forficata*. **a**: cromatografia em coluna de SiO<sub>2</sub> usando-se como eluente o sistema n-hexano/AcOEt/MeOH com polaridade crescente.

### 2.1.6 Caracterização dos compostos isolados

#### Composto 1: kaenferol

**PF (°C):** 278-280; **IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3384, 1660, 1610, 1514, 1494; **RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5; **RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5; **EMIE m/z (int. rel.):** 286 (100%) [M<sup>+</sup>].

#### Composto 2: kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo

**PF (°C):** 208.4-209.5; **IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3322, 1658, 1590, 1554, 1496; **RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5; **RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5.

#### Composto 3: kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo

**PF (°C):** 198.5-201.3; **I.V.(KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3340, 1650, 1592; **RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5; **RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5; **EMIE m/z (int. rel.):** 286 (100%) [M<sup>+</sup>].

#### Composto 5: kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo

**PF (°C):** 184-190; **I.V.(KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3376, 1656, 1592, 1546, 1488; **RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5; **RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):** Tabela 5.



## 2.2 ESTUDO DE EQUILÍBRIO QUÍMICO DO KAENFEROL-3,7-O-( $\alpha$ )-DIRAMNOSÍDEO-VO(IV)

### 2.2.1 Materiais e métodos

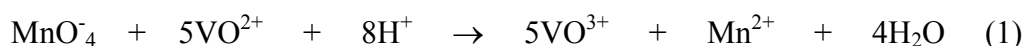
#### 2.2.1.1 Ligante

O ligante kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**3**) foi isolado da fração n-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* conforme descrito no item 2.1.5 da Parte Experimental.

#### 2.2.1.2 Reagentes

O sulfato de vanádio (VOSO<sub>4</sub>) (Aldrich), o cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) (Labsynth) e o cloreto de potássio (KCl) (Vetec) de grau analítico p.a. foram utilizados sem prévia purificação. As soluções de hidróxido de potássio (KOH) 0,100 mol.L<sup>-1</sup> isentas de carbonatos (CO<sub>2</sub>) foram preparadas com ampolas Diluit-it (Baker) e padronizadas através de titulações com biftalato ácido de potássio (KHP) (Sigma), usando fenoftaleína como indicador.

A solução estoque de VO(IV) foi preparada pesando-se quantidades equimolares de VOSO<sub>4</sub> e BaCl<sub>2</sub> e diluindo em água previamente bidestilada e fervida (para evitar a presença de CO<sub>2</sub> dissolvido) a 80 °C até completa precipitação de sulfato de bário (BaSO<sub>4</sub>, sólido branco), que foi removido por filtração. A concentração exata do metal em solução foi determinada através da titulação da mesma com solução padrão de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) através do método que utiliza a reação de óxido-redução<sup>44</sup> (Equação 1):



Foi preparada uma solução estoque de etanol e água bidestilada e fervida 70/30 %, v/v, com adição de KCl 0,100 mol.L<sup>-1</sup> (força iônica). Ácido clorídrico 1,0 x 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> foi adicionado a solução etanólica e titulado com KOH padrão, livre de CO<sub>2</sub>, para determinar o

pK<sub>w</sub> desta solução e ser utilizada como padrão de calibração dos eletrodos e do pHmetro, com o objetivo de ler diretamente  $-\log[H^+]$  ou seja p[H].

#### 2.2.1.3 Solventes

Devido à baixa solubilidade do ligante em meio aquoso, os experimentos foram realizados em meio etanólico (EtOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v), mantendo força iônica constante em 0,100 mol.L<sup>-1</sup> (KCl).

O etanol P.A., foi adquirido do Grupo Química e utilizado como recebido.

#### 2.2.1.4 Medidas de equilíbrio potenciométrico

A titulação potenciométrica do ligante kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo foi realizada em uma célula termostatizada e selada, com capacidade de 50 mL, mantendo a temperatura constante em  $25,00 \pm 0,05$  °C, com banho termostatizado de água circulante em sistema fechado, de fabricação Microquímica. A atmosfera foi mantida inerte por um fluxo contínuo de argônio, fornecido pela White Martins e purificado pela passagem do fluxo de gás através de uma solução de pirogallol em KOH etanólico. Durante a titulação, as soluções foram mantidas sob constante agitação pelo uso de um agitador magnético (Figura 6).

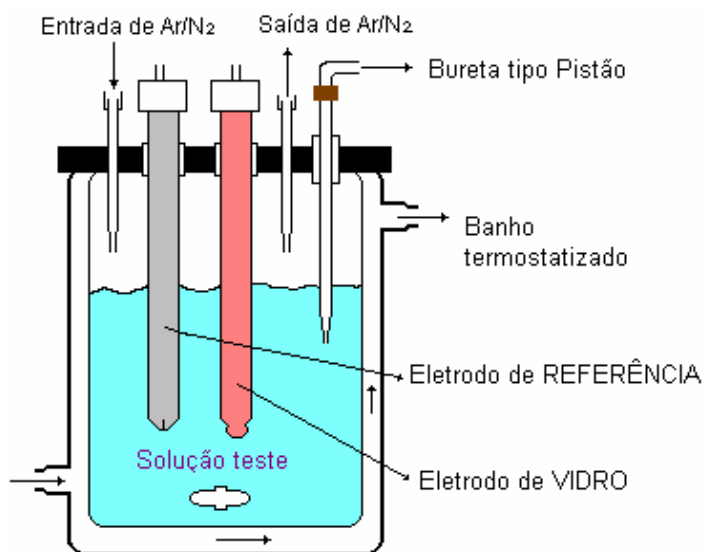


Figura 6: Sistema utilizado na titulação potenciométrica.

O sistema de medida de  $p[H]$  foi composto de um eletrodo de referência tipo  $Ag/AgCl$  e um eletrodo de vidro, ambos da marca Ingold, conectados a um pHmetro da marca CORNING, modelo 350. O titulante foi adicionado em alíquotas de 0,01 mL a partir de uma bureta automática tipo pistão de 20 mL de capacidade da marca SCHOTT GERATE. A inclinação da resposta do pHmetro foi ajustada através de titulações de soluções etanólicas ( $EtOH/H_2O$  70:30 v/v) padrões de  $HCl$   $0,010\ mol.L^{-1}$  com  $KOH$  etanólico ( $EtOH/H_2O$  70:30 v/v) padrão  $0,100\ mol.L^{-1}$ , livre de  $CO_2$ . Antes de cada titulação potenciométrica, o sistema (pHmetro + eletrodos) foi calibrado e ajustado com a solução etanólica de  $HCl$ , diluído e de  $p[H]$  conhecido, para obter a leitura direta de  $-\log[H^+]$ , durante a titulação, e a força iônica foi mantida constante em  $0,100\ mol.L^{-1}$  com a adição de  $KCl$ .

O  $pK_w$  da água em presença de etanol ( $EtOH/H_2O$  70:30 v/v) foi determinado por titulação potenciométrica, acompanhando a variação do  $p[H]$  da solução/solvente acidificada com  $HCl$  de concentração conhecida, pela adição de alíquotas de  $KOH$  etanólico padrão, obtendo-se o valor de 14,76, comparável ao valor da literatura para um sistema  $EtOH$  25 % +  $H_2O$  75 %, onde o valor é de 14,78<sup>45</sup>.

### 2.2.1.5 Computação

Os cálculos das constantes de protonação e das constantes de complexação foram determinados com a ajuda do programa computacional BEST7<sup>46</sup> e as curvas de distribuição das espécies foram obtidas com o auxílio dos programas SPE e SPEPLOT<sup>46</sup>.

## 2.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 2.3.1 Preparação da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* e do seu constituinte majoritário

A fração *n*-butanólica das folhas foi concentrada até total remoção do solvente. Devido à baixa solubilidade da fração *n*-butanólica e de seu constituinte majoritário em meio aquoso, as soluções foram preparadas em meio etanólico (EtOH/H<sub>2</sub>O 1:9, v/v).

### 2.3.2 Animais experimentais

Ratos machos adultos (linhagem Wistar) pesando 165-190 g foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração comercial e tiveram livre acesso à água. A temperatura da sala foi mantida entre 23-25 °C e com ciclo de 12 h claro/12 h escuro. Animais, descritos como jejum, foram privados de comida pelo menos 16 h, mas com acesso livre à água.

Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo 066/CEUA/UFSC.

### 2.3.3 Animais diabéticos induzidos com aloxana

O diabetes foi induzido através de uma única injeção intravenosa de monohidrato de aloxana (Sigma) 5% em soro fisiológico na dose de 60 mg/Kg de peso corporal em animais sob anestesia etérea. Esta solução foi sempre preparada imediatamente antes do uso. Três dias depois foram coletadas as amostras de sangue e os níveis de glicose foram determinados para confirmar o desenvolvimento do diabetes. Foram considerados diabéticos apenas ratos que apresentavam glicose entre 325-520 mg/dL de glicose<sup>47</sup>.

### 2.3.4 Efeito agudo da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* e de seu constituinte majoritário em animais normais

Ratos em jejum foram divididos em três grupos de seis animais. Grupo I (controle), não tratado; Grupo II (veículo), recebeu somente o veículo (1% EtOH/H<sub>2</sub>O, v/v) e Grupo III (tratado), recebeu diferentes doses (400, 500, 600 e 800 mg/Kg de peso corporal) da fração *n*-butanólica e diferentes doses de seu constituinte majoritário (50, 100 e 200 mg/Kg de peso corporal), ambos suspensos no veículo. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após o tratamento.

### 2.3.5 Efeito agudo da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* e de seu constituinte majoritário em animais normais hiperglicêmicos

Ratos em jejum foram divididos em quatro grupos de seis animais cada. Grupo I, (normal), não tratado; Grupo II (hiperglicêmico), recebeu somente glicose (4 g/Kg de peso corporal); Grupo III (tratado), recebeu glicose (4 g/Kg) juntamente com a dose de 800 mg/Kg de peso corporal da fração *n*-butanólica e a dose de seu constituinte majoritário 100 mg/Kg de peso corporal, ambos suspensos no veículo e Grupo IV, recebeu 100 mg/Kg de peso corporal de tolbutamida suspenso no veículo. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 180 minutos após o tratamento.

### **2.3.6 Efeito agudo da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* e de seu constituinte majoritário em animais diabéticos induzidos com aloxana**

Ratos em jejum foram divididos em três grupos de seis animais cada. Grupo I, (diabético), não tratado; Grupo II (veículo), recebeu somente o veículo (1% EtOH/H<sub>2</sub>O v/v) e Grupo III (tratado), recebeu diferentes doses (400, 600 e 800 mg/Kg de peso corporal) da fração *n*-butanólica e diferentes doses de seu constituinte majoritário (50, 100 e 200 mg/Kg de peso corporal), ambos suspensos no veículo. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após o tratamento.

### **2.3.7 Efeito agudo da administração oral e intraperitoneal do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosideo-VO(IV) em animais diabéticos induzidos com aloxana**

Ratos em jejum foram divididos em quatro grupos de seis animais cada. Grupo I, (diabético), não tratado; Grupo II (veículo), recebeu somente o veículo (1% EtOH/H<sub>2</sub>O, 3.0 mL Kg<sup>-1</sup>, v.o. e i.p.); Grupo III (tratado), recebeu solução estoque de vanádio(IV) pelas vias intraperitoneal e oral (3.0 mL Kg<sup>-1</sup>) e Grupo IV (tratado), recebeu o complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosideo-VO(IV) intraperitonealmente e oralmente na dose de 100 mg/Kg de peso corporal (3.0 mL Kg<sup>-1</sup>), ambos suspensos no veículo. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após o tratamento.

### **2.3.8 Coleta do sangue**

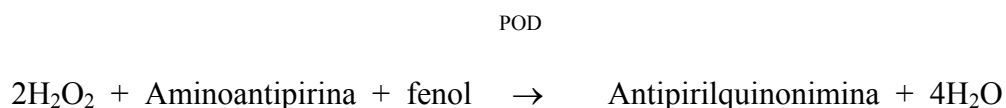
Todos os animais estavam em jejum de 16 h antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado por capilaridade pelo plexo retro-orbital em tubos de eppendorf. Após centrifugadas, alíquotas de 10  $\mu$ L de plasma (em duplicatas) foram utilizados para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (GLICOSE PAP da LABTEST). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e as absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro da marca Pharmacia LKB-Ultrospec III em 505 nm. Todas as dosagens glicêmicas foram feitas dentro de uma hora após a coleta do sangue. Os resultados foram expressos em mg/dL de glicose.

**Princípio do método:**

A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação de acoplamento oxidativo que forma uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

**2.3.9 Dados e análise estatística**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M., conforme número de amostras especificados nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05<sup>48</sup>.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA* LINK

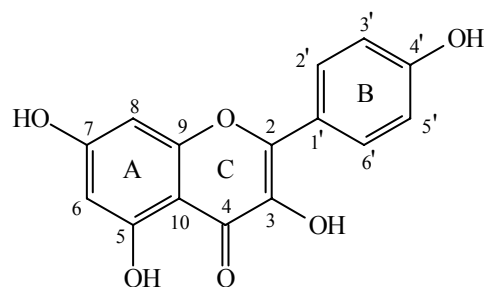
Os sucessivos fracionamentos cromatográficos sobre sílica gel das frações solúveis em acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *B. forficata* Link (Leguminosae) levaram ao isolamento do  $\beta$ -sitosterol e dos flavonóides kaenferol (**1**), kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**3**), quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**4**), kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1"-6")-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**5**) e quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1"-6")-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**6**). O flavonóide kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**2**) foi obtido quando metodologia similar foi aplicada à porção solúvel em acetato de etila das flores desta mesma espécie vegetal.

As estruturas moleculares dos constituintes químicos foram estabelecidas com base em evidências espectroscópicas, principalmente espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, envolvendo inclusive comparação com dados encontrados na literatura.

##### 3.1.1 Identificação do kaenferol (**1**)

O composto **1**, isolado como um sólido amorfo amarelo com ponto de fusão 278-280°C, foi devidamente identificado como [5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)]-4*H*-1-benzopiran-3-hidroxi-4-ona, comumente chamado de kaenferol (Figura 7).





**1**

**Figura 7: Estrutura química do composto 1 (kaenferol).**

No espectro de infravermelho foram observadas, entre outras, bandas de absorção relacionadas a sistemas aromáticos ( $1610$ ,  $1514$ ,  $1494\text{ cm}^{-1}$ ), à função carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ) e a grupos hidroxilas ( $3384\text{ cm}^{-1}$ ).

A unidade flavonoídica foi caracterizada como 4',3,5,7-tetraidroxiflavona após a análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , onde foram reconhecidos um par de dupletos relacionados a dois átomos de hidrogênios aromáticos que mantém relação *meta* entre si e atribuídos à H-6 ( $\delta_{\text{H}} 6.27$ , *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$ ) e H-8 ( $\delta_{\text{H}} 6.52$ , *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$ ); e sinais para um sistema de *spin* do tipo AA'BB' típico de anel benzênico *p*-dissubstituído [ $\delta_{\text{H}} 8.12$  e  $6.99\text{ ppm}$  ( $J = 8.8\text{ Hz}$ )].

A comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  desacoplado e RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  permitiu o reconhecimento de sinais relacionados a quinze átomos de carbono, sendo: um carbonílico ( $\delta_{\text{C}} 176.62\text{ ppm}$ ), seis  $sp^2$  oxigenados ( $\delta_{\text{C}} 165.08$ ,  $162.31$ ,  $160.02$ ,  $157.83$ ,  $147.05$ ,  $136.68$ ), seis  $sp^2$  metínicos ( $\delta_{\text{C}} 130.49$ ,  $116.35$ ,  $99.19$ ,  $94.54\text{ ppm}$ ), dois  $sp^2$  quaternário ( $123.36$ ,  $104.16\text{ ppm}$ ). Todos os tipos de átomos de carbono corroboram com a estrutura de uma flavona com padrão de oxigenação 5,7-dihidroxi para o anel A, 4'-hidroxi para o anel B e 3-hidroxi para o anel C.

O espectro de massas por impacto eletrônico a  $70\text{ eV}$  do composto 1 mostrou o pico correspondente ao íon molecular de  $m/z 286\text{ u.m.a.}$  (100%) representante da fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ , que segundo a relação entre o número de átomos de carbono e

hidrogênio indicou um total de onze insaturações, o que é compatível com a estrutura proposta.

A confirmação da estrutura e a atribuição correta dos sinais de carbono-13 (Tabela 5) foram obtidas a partir da comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono da amostra com os valores referenciados por Agrawal<sup>49</sup>.

### 3.1.2 Identificação dos flavonóides glicosilados 2-6

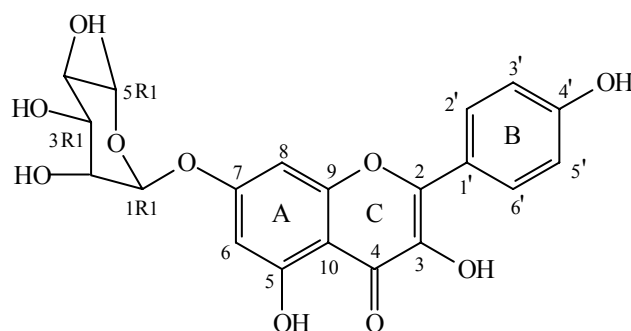
Os espectros de massas das substâncias glicosiladas **2-6** não revelaram a presença de fragmentos correspondentes aos íons moleculares, porém, apresentaram o pico de maior intensidade em  $m/z$  286, que representa a unidade aglicona de fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_6$ . Notando-se em todos estreita semelhança com o kaenferol ( $[M]^+$  286,  $C_{15}H_{10}O_6$ ).

Os compostos **2**, **3** e **5**, obtidos como sólidos amorfos com pontos de fusão 208.4-209.5 °C, 198.5-201.3 °C e 184-190 °C, respectivamente, apresentaram perfis na região do infravermelho semelhantes ao do composto **1**, entretanto, notou-se em adicional, intensas e largas bandas de absorção relacionadas a grupos hidroxílicos ( $3320-3380\text{ cm}^{-1}$ ) que rapidamente sugeriram a presença de unidades glicosídicas em suas estruturas moleculares.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  de **2**, **3** e **5** estavam preservadas as absorções pertinentes à unidade aglicona kaenferol (**1**); neles foram reconhecidos sinais de sistemas dos tipos *AB*, correspondentes a dois átomos de hidrogênio que mantêm entre si relação *meta* e atribuídos aos hidrogênios H-6 [ $\delta_{\text{H}}$  6.41 ppm, *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$  (**2**);  $\delta_{\text{H}}$  6.44 ppm, *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$  (**3**);  $\delta_{\text{H}}$  6.44 ppm, *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$  (**5**)] e H-8 [ $\delta_{\text{H}}$  6.81 ppm, *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$  (**2**);  $\delta_{\text{H}}$  6.79 ppm, *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$  (**3**);  $\delta_{\text{H}}$  6.79 ppm, *d*,  $J = 2.2\text{ Hz}$  (**5**)], e AA'BB' típico de anel B de flavonóides *p*-dissubstituído [ $\delta_{\text{H}}$  8.07 e 6.92 ppm, *d*,  $J = 8.8\text{ Hz}$  (**2**);  $\delta_{\text{H}}$  7.78 e 6.91 ppm, *d*,  $J = 8.8\text{ Hz}$  (**3**);  $\delta_{\text{H}}$  8.08 e 6.86 ppm, *d*,  $J = 8.8\text{ Hz}$  (**5**)]. A hidrólise ácida com solução alcoólica a 10% de HCl também contribuiu na elucidação estrutural. A análise por CCF dos produtos fornecidos pelos glicosídeos **2** e **3** revelou a presença de kaenferol e ramnose, e a hidrólise de **5** resultou em kaenferol, ramnose e glicose.

A fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{10}$  do glicosídeo **2** foi deduzida pela comparação dos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (HBBD, HMQC e HMBC), permitindo

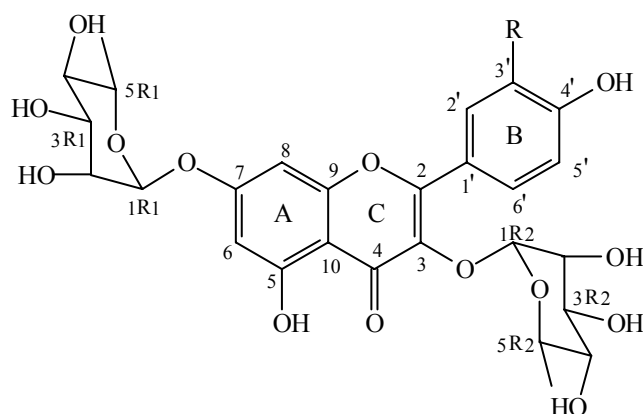
reconhecer os sinais correspondentes aos átomos de carbono não hidrogenados (nove carbonos quaternários  $sp^2$ , inclusive uma carbonila em  $\delta_C$  176,09), metínicos (quatro sinais reapresentando seis carbonos  $sp^2$  e cinco  $sp^3$  oxigenados, incluindo um anomérico em  $\delta_C$  98,84 correlacionado com o sinal em  $\delta_H$  5,53, singlete largo, no espectro HMQC) e metílico (grupo metila da ramnose em  $\delta_C$  17,94 correlacionado com o sinal em  $\delta_H$  1,12, dubleto com  $J = 6,2$  Hz, no HMQC). Estes dados suportam a idéia de uma estrutura molecular que apresenta um centro flavonoídico (kaenferol) associada a uma unidade de ramnose. A presença desta unidade foi confirmada pela análise dos demais sinais dos espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  (Tabela 5). A localização da unidade glicosídica no átomo de oxigênio ligado ao carbono C-7 da aglicona baseou-se nos seguintes dados espectrais: a) o deslocamento químico do hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  5.53 ppm (d,  $J = 1.8$  Hz, hidrogênio H-1 da ramnose em posição equatorial) revelou-se compatível com a localização do açúcar na posição O-7, que foi confirmada pela interação heteronuclear deste hidrogênio ( $^3J_{CH}$ ) com o C-7 ( $\delta_C$  161,42) revelada pelo espectro 2D HMBC (Tabela 6); b) o sinal em  $\delta_H$  12,45 no espectro de RMN  $^1H$  indicou a presença de HO-5, posição de absorção típica de hidroxila quelatogênica em anel de seis membros; c) o sinal de hidroxila em  $\delta_H$  10,10 foi atribuído ao grupo hidroxila 4'-OH pelo acoplamento heteronuclear a longa distância ( $^3J_{CH}$ ) com os carbonos CH-3' e CH-5' ( $\delta_C$  115,48) observado no espectro HMBC (Tabela 6), onde também se observa correlação entre o hidrogênio 9,50 ppm (HO-3) e o carbono C-2 ( $\delta_C$  147,50). Assim a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono (Tabela 5) e hidrogênio, baseada nas análises detalhadas dos espectros de 1D e 2D de RMN, e a comparação com os dados da literatura<sup>49</sup> permitiram definir a estrutura do composto **2** como kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilkaenferol) (Figura 8), isolado anteriormente da espécie vegetal *Plantus acerifolia*<sup>50</sup>, porém sendo descrito pela primeira vez como constituinte da *Bauhinia forficata*.



**2**

Figura 8: Estrutura química do composto **2** (kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo).

O glicosídeo **3**, isolado na forma de um sólido amorfo e já descrito como constituinte químico desta espécie, foi identificado como kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (3,7-di-O-L-ramnopiranosilkaenferol) (Figura 9) com base na análise dos espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e na comparação dos dados espectrais com os dados do composto **2**, que permitiram reconhecer a presença de uma unidade  $\alpha$ -L-ramnose adicional ligada ao átomo de oxigênio do carbono C-3 pelo deslocamento químico do C-2 em  $\delta_{\text{C}}$  157,77 (Tabela 5). O deslocamento químico do carbono C-2 da flavona (3-hidroxiflavona) com grupo hidroxila livre no C-3 aparece em torno de  $\delta_{\text{C}}$  147, como revelam as substâncias **1** e **2** (Tabela 5). Assim, a estrutura química do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**3**) foi estabelecida, estando os seus dados espectrais em acordo com os valores descritos na literatura<sup>51</sup>.



3      R = H

4      R = OH

Figura 9: Estrutura química do composto **3** (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo) e do composto **4** (quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo).

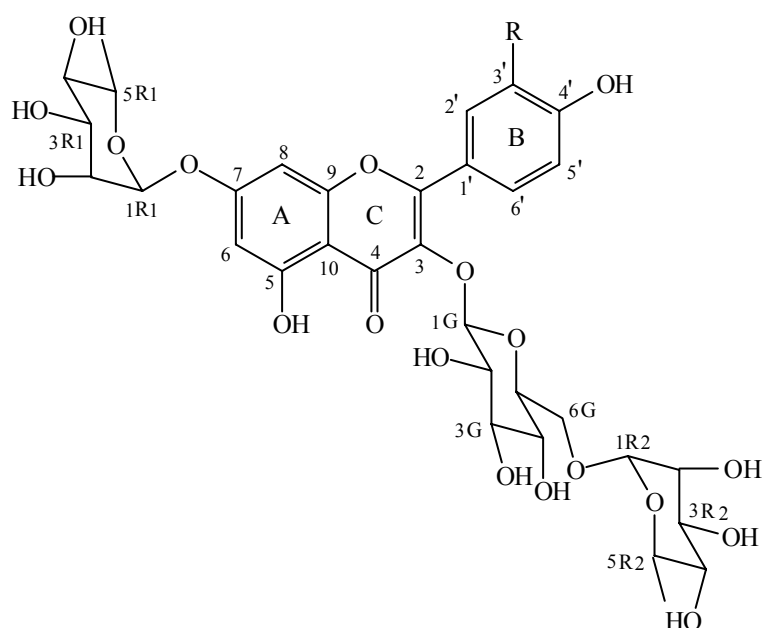
Após a caracterização e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio ( $\delta_H$ ) e carbono ( $\delta_C$ ) de **3** (Tabela 5) verificou-se a existência de sinais adicionais nos espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ , que permitiram postular a presença da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (**4**) (3,7-di-O-L-ramnopiranosilquercetina) (Figura 9), presente em menor percentagem. Os deslocamentos químicos dos sinais de átomos de hidrogênio em  $\delta_H$  6.43 [d,  $J$  = 2.1 Hz, H-6], 6.77 [d,  $J$  = 2.1 Hz, H-8], 6.74 [d,  $J$  = 1.7 Hz, H-2'], 6.87 [d,  $J$  = 8.3 Hz, H-5'] e 7.28 [dd,  $J$  = 8.3 e 1.7 Hz, H-6'] e de carbono em  $\delta_C$  120.58 (C-1'), 115.72 (CH-2'), 145.23 (C-3'), 148.61 (C-4'), 114.91 (CH-5') e 121.21 (CH-6') observados nos espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$ , respectivamente, permitiram deduzir a estrutura **4**. Análise por CCF também revelou a presença de um componente minoritário de menor  $R_f$  do que de **3**, justificando-se a maior polaridade de **4** pela presença de uma hidroxila no átomo de carbono C-3'.

O composto **5** foi caracterizado como um kaenferol triglicosilado. As três unidades glicosídicas foram identificadas como duas ramnoses e uma glicose com base nos dados espectrais de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$ . A presença de uma unidade  $\alpha$ -L-ramnose ligada ao

oxigênio do carbono C-7 foi deduzida pelos sinais em  $\delta_H$  5.53 (singleto largo, H-1R1, hidrogênio H-1 da ramnose em posição equatorial) e  $\delta_C$  161.61 atribuído ao C-7, como observado em **2** e **3** (*vide supra* e Tabela 5). Esta dedução foi confirmada pelo espectro HMBC (Tabela 6) através do acoplamento heteronuclear ( $^3J_{CH}$ ) entre o hidrogênio anomérico H-1R1 ( $\delta_H$  5.53) e o carbono C-7 ( $\delta_C$  161.61). A caracterização e a localização da unidade diglicosídica  $\alpha$ -L-ramnose-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicose no átomo de oxigênio do carbono C-3 baseou-se nos seguintes argumentos: a) o deslocamento químico do átomo de carbono C-2 ( $\delta_C$  157.05), revelado pelo espectro de RMN  $^{13}C$  sugeriu a presença de glicosídeo em C-3, como observado em **3** (Tabela 5); b) a correlação a longa distância do hidrogênio anomérico H-1G ( $\delta_H$  5.34, d,  $J=7.7$  Hz, hidrogênio da glicose em posição axial) e o carbono C-3 ( $\delta_C$  133.53,  $^3J_{CH}$ ) observada no espectro HMBC (Tabela 6) permitiu definir a ligação 3-O- $\beta$ -D-glicose; c) o deslocamento químico do átomo de carbono metilênico CH<sub>2</sub>-6G ( $\delta_C$  65.25) permitiu a localização da unidade ramnose restante neste átomo de carbono, já que o sinal do grupo hidroximetilênico livre de uma unidade glicose aparece em torno de  $\delta_C$  62; d) o espectro HMBC (Tabela 6) revelou a interação heteronuclear do hidrogênio anomérico H-1R2 ( $\delta_H$  4.39, singleto largo de hidrogênio em posição equatorial) da ramnose com o carbono CH<sub>2</sub>-6G ( $\delta_C$  65.25) da glicose.

Assim, a estrutura deste glicosídeo foi caracterizada como kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**5**) (3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil]-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilkaenferol) (Figura 10). Embora esta estrutura já tenha sido descrita anteriormente como constituinte da espécie vegetal *Lens esculenta*<sup>52</sup>, não foram encontrados dados de RMN  $^{13}C$ .

O espectro de RMN  $^1H$  de **5** mostrou a presença de sinais adicionais correspondentes a um componente minoritário contendo a quercetina como aglicona. Esta dedução baseou-se na presença dos sinais em  $\delta_H$  6.42 [d,  $J = 2.2$  Hz, H-6], 6.75 [d,  $J = 2.2$  Hz, H-8], 7.57 [d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'], 6.82 [d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'] e 7.67 [dd,  $J = 8.5$  e 2.1 Hz, H-6'] observados no espectro de RMN  $^1H$  e na análise por CCF, que revelou a presença de componente em menor percentagem em menor Rf. Estes resultados permitem postular a presença de quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**6**) (3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil]-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilquercetina) (Figura 10).



5      R = H

6      R = OH

Figura 10: Estrutura química do composto **5** (kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo) e do composto **6** (quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo).

Tabela 5: Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do kaenferol (**1**) e dos glicosídeos **2**, **3** e **5**, registrados em DMSO- $d_6$  usando aparelho que opera a 600 MHz para hidrogênio e 150 MHz para carbono-13. Deslocamentos químicos em  $\delta$  ( $\delta_{\text{H}}$  e  $\delta_{\text{C}}$ ) e constantes de acoplamento ( $J$ , entre parênteses) em Hz\*.

	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>5</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
C								
2	-	147.0	-	147.50	-	157.77	-	157.04
3	-	136.6	-	136.05	-	134.55	-	133.53
4	-	176.6	-	176.09	-	177.92	-	177.61
5	-	162.3	-	160.39	-	160.93	-	160.80
6	6.27(d,2.2)	99.19	6.41(d,2.2)	98.39	6.44(d,2.2)	98.50	6.44(d,2.2)	99.32
7	-	165.0	-	161.42	-	161.70	-	161.61
8	6.52(d,2.2)	94.54	6.81(d,2.2)	94.36	6.79(d,2.2)	94.59	6.79(d,2.2)	94.62
9	-	157.8	-	155.75	-	157.77	-	155.99
10	-	104.1	-	104.70	-	105.79	-	105.57
1'	-	123.3	-	121.55	-	120.58	-	120.67
2',6'	8.12(d,8.8)	130.4	8.07(d,8.8)	129.68	7.78(d,8.8)	130.68	8.08(d,8.8)	131.03
3',5'	6.99(d,8.8)	116.3	6.92(d,8.8)	115.48	6.91(d,8.8)	115.42	6.86(d,8.8)	115.08
4'	-	160.0	-	159.39	-	160.14	-	160.11
1R1	-	-	5.53(d,1.8)	98.84	5.53(d,1.8)	98.50	5.53(d,1.6)	98.43
2R1	-	-	3.85(sl)	69.88	3.83(sl)	70.26	3.84	69.79
3R1	-	-	3.64(dl,9.0)	70.26	3.63	69.80	3.63	70.25
4R1	-	-	3.40	71.61	3.29(t,9.2)	71.61	3.30	71.59
5R1	-	-	3.45	70.09	3.44(m)	70.06	3.35	68.21
6R1	-	-	1.12(d,6.2)	17.94	1.12(d,6.2)	17.94	1.12(d,6.1)	17.85
1R2	-	-	-	-	5.29(sl)	101.91	4.39(d,1.5)	99.99
2R2	-	-	-	-	3.97(sl)	70.35	3.29	70.58
3R2	-	-	-	-	3.48(dl)	70.64	3.40	70.04
4R2	-	-	-	-	3.13(m)	72.39	3.08(dl,9.3)	71.90
5R2	-	-	-	-	3.44(m)	70.06	3.62	67.98



	1		2		4		5	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$		$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
C								
6R2	-	-	-	-	0.79(d,6.2)	17.45	1.05(d,6.1)	17.85
1G	-	-	-	-	-	-	5.34(d,7.7)	101.85
2G	-	-	-	-	-	-	3.38	71.07
3G	-	-	-	-	-	-	3.56	73.62
4G	-	-	-	-	-	-	3.58	70.37
5G	-	-	-	-	-	-	3.39	72.96
6G	-	-	-	-	-	-	3.60	65.25
OH								
5	12.18(sl)	-	12.45(s)	-	12.69(s)	-	-	-
3	-	-	9.50(sl)	-	-	-	-	-
4'	-	-	10.10(sl)	-	10.22(sl)	-	-	-

\* Os sinais dos átomos de carbono quaternários, metínicos e metílicos foram reconhecidos pela análise comparativa dos espectros HBBD e HMBC. Os espectros 2D de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$  ( $n = 1$ ; HMQC;  $n = 2$  e  $3$ , HMBC) foram também usados na atribuição dos deslocamentos químicos. Os deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio sem indicação de multiplicidade indicam sinais envolvidos em superposição e os valores descritos representam aproximações deduzidas pelos espectros 2D HMQC e HMBC.

Tabela 6: Dados de interação heteronuclear spin-spin a longa distância ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ) de átomos de carbono e hidrogênio obtidos dos espectros HMBC de **2** e **5**\*.

	<b>2</b>			<b>5</b>		
C	$\delta_C$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	147.50	-	HO-3;2H-2',6'	157,05	-	2H-2',6'
3			-	133,55	-	H-1G
5	160.39	HO-5;H-6	-	160,84	H-6	
6	98.84	-	HO-5;H-8	99,32	-	H-8
7	161.42	H-7;H-8	1-HR1	161,61	H-6;H-8	H-1R1
8	94.36	-	H-6	94,62	-	H-6
9	155.75	H-8	-	155,99	H-8	-
10	104.70	-	HO-5;H-6;H-8	105,57	-	H-6;H-8
1'	121.55		2H-3'',5'	120,67		2H-3',5'
3',5'	115.48		HO-4'	115,08		
4'	159.39	HO-4';2H-	2H-2',6'	160,11	2H-3',5'	2H-2',6'
1R1	98.39	-				
2R1	69.87	H-1R1;H-3R1	H-4R1	69,79	H-1R1	
3R1	70.26	H-2R1	H-1R1	70,25	H-2R1;H-4R1	H-1R1
4R1	71.61	H-5R1	3H-6R1	71,59	H-3R1	3H-6R1
5R1	70.09	H-4R1;3H-	H-1R1	68,21	3H-6R1	H-3R1
1R2	-	-	-	99,99		
2R2	-	-	-	70,58	H-2R2	
3R2	-	-	-	70,04		
4R2	-	-	-	71,90		3H-6R2
5R2	-	-	-	67,98	3H-6R2	H-1R2
6R2	-	-	-	17,85		H-4R2
1G	-	-	-	101,85		H-3G
2G	-	-	-	71,07		
3G	-	-	-	73,62		H-5G
4G	-	-	-	70,37		
5G	-	-	-	72,95		H-3G
6G	-			65,24		H-1G;H-4G

\* Os sinais dos átomos de carbono quaternários, metínicos e metílicos foram reconhecidos pela análise comparativa dos espectros HBBD- e DEPT-RMN  $^{13}\text{C}$ . Os espectros 2D de correlação heteronuclear HMQC foram também usados na atribuição dos deslocamentos químicos. Os deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio ( $\delta_H$ ) encontram-se descritos na Tabela 5.

### 3.2 ESTUDO DE EQUILÍBRIO QUÍMICO DO KAENFEROL-3,7-O-( $\alpha$ )-DIRAMNOSÍDEO-VO(IV)

#### 3.2.1 Medidas do equilíbrio potenciométrico do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV)

As curvas de titulação potenciométrica do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) são mostradas na Figura 11. A curva A representa o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo sozinho e a curva B representa o sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) na razão 2:1.

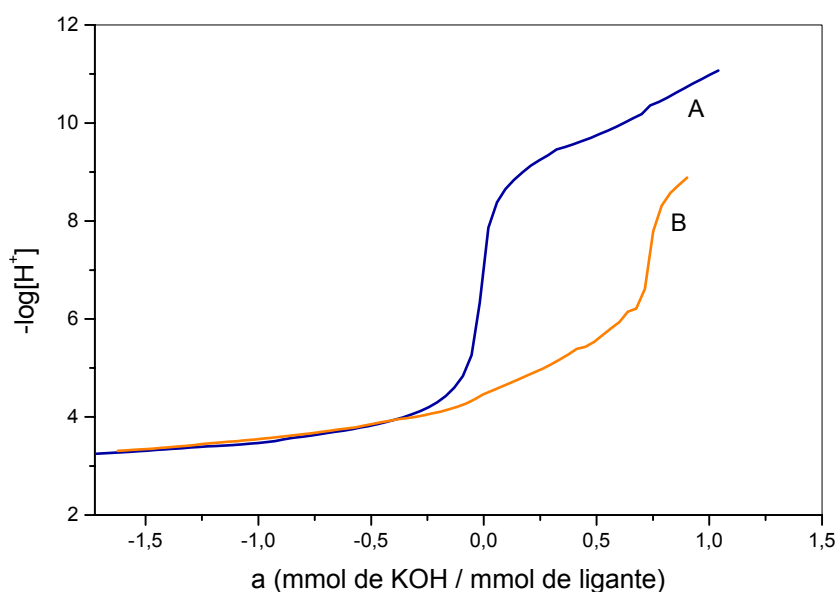
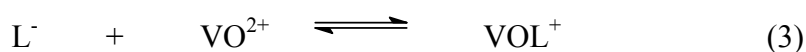
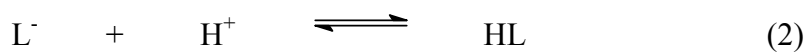


Figura 11: Curvas dos dados experimentais de equilíbrio potenciométrico para o sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e força iônica  $\mu = 0,100$  mol.L<sup>-1</sup> (KCl). A) 0,05478 mmol de kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em 35,00 mL de solução EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30); B) 0,05490 mmol kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e 0,02610 mmol de VO(IV) em 35,00 mL de solução EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).

Os valores negativos na abscissa são quantidades de ácido adicionado em excesso e neutralizado pela base. A curva A tem duas regiões tamponadas, uma em valores baixos de  $p[H]$  devido à neutralização do excesso de ácido adicionado e o segundo tampão entre  $p[H]$  8,5 até 10,5, devido ao equilíbrio ácido-base do ligante (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo). A curva B possui uma região tampão até  $a = 0,75$  mol de KOH/mol de ligante, correspondendo a neutralização de 0,75 mol de prótons do ligante. Os experimentos foram interrompidos em  $p[H]$  9,0, devido à precipitação, provavelmente um produto da hidrólise do íon metálico (VO(IV)).

As constantes dos equilíbrios de protonação e a formação das espécies complexadas do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo com o íon VO(IV) são definidas pelas Equações 2-6, onde  $L^-$  e HL representam as espécies desprotonado e protonado do ligante, respectivamente;  $VO^{2+}$  é o íon metálico aquoso e  $VOL^+$ ,  $VOL_2$ ,  $VOH_1L$  e  $VOH_1L_2$  são as espécies mononucleares dos complexos formados com nenhuma ou uma hidroxila. Os valores das constantes desses equilíbrios estão listados na Tabela 7.



A constante de protonação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, definida pela Equação 2 tem um valor de 9,14. Essa protonação é atribuída ao grupo fenolato do anel “A” do flavona. A estequiometria indica que 0,75 mol de prótons do ligante é neutralizado em valores de p[H] menores que 5,5 devido a complexação do íon metálico que retira o próton do grupo ‘A’ da flavona.

Tabela 7: Constantes de protonação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e suas constantes de ligação com íon metálico VO(IV) a  $25.00 \pm 0.05$  °C e  $\mu = 0.100$  mol.L<sup>-1</sup> (KCl).

Espécies	Log K
$[\text{HL}]/[\text{H}^+] [\text{L}^-]$	9,14
$[\text{VOL}^+]/[\text{VO}^{2+}] [\text{L}^-]$	8,50
$[\text{VOH}_1\text{L}]/[\text{H}^+]/[\text{VOL}^+]$	-5,03
$[\text{VOL}_2]/[\text{VOL}^+] [\text{L}^-]$	7,50
$[\text{VOH}_1\text{L}_2]/[\text{H}^+]/[\text{VOL}_2]$	-8,06

As curvas de distribuição das espécies do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) (2:1) em função de  $-\log[\text{H}^+]$  são mostradas na Figura 12. O íon metálico livre atinge um máximo de 96.5% em p[H] 2,0 e à medida que os valores de p[H] aumentam o íon metálico livre diminui, dando lugar a espécie  $\text{VOL}^+$ . Esta espécie atinge um máximo de formação de 56% em p[H] 4,1 e decresce em valores de p[H] maiores que 6,0. Em p[H] fisiológico (7,4), há a predominância de duas espécies  $\text{VOL}_2$  e  $\text{VOH}_1\text{L}$ , elas são formadas com 43% e 45%, respectivamente. A espécie  $\text{VOH}_1\text{L}_2$  predomina em valores de p[H] acima de 8,0, onde atinge um máximo de formação de 85%. Estes resultados de equilíbrio nos dirigem a verificar a atividade hipoglicêmica das espécies  $\text{VOL}_2$  e  $\text{VOH}_1\text{L}$ .

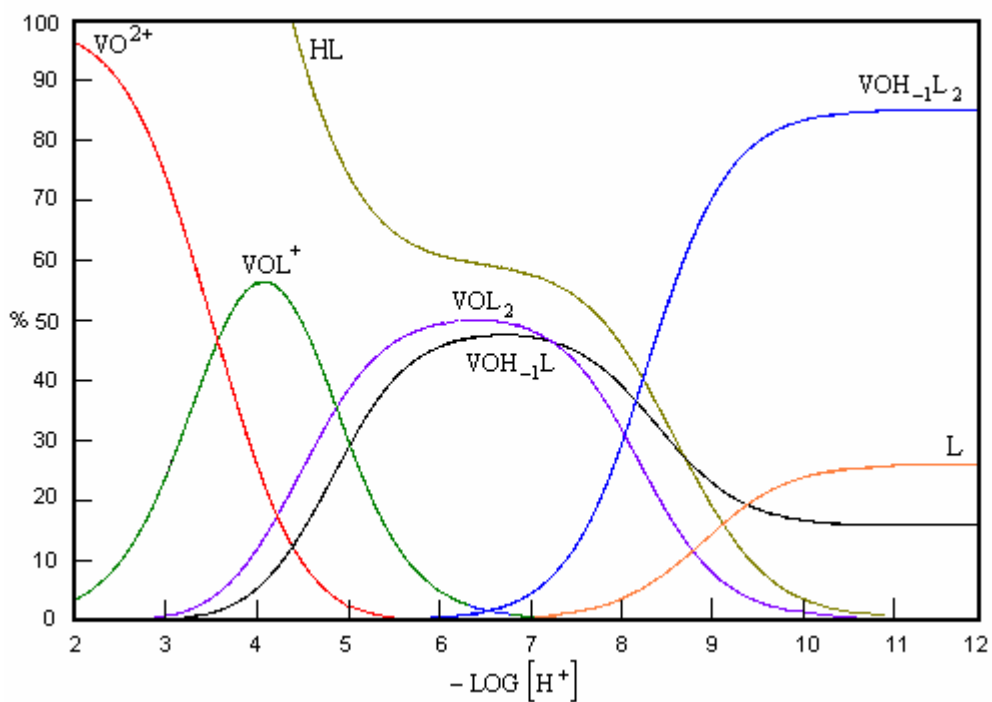
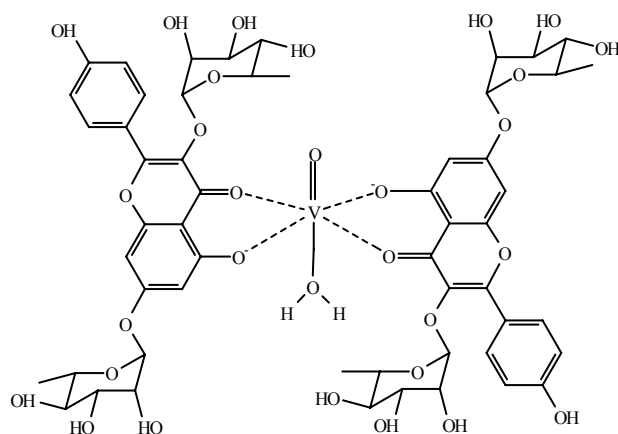
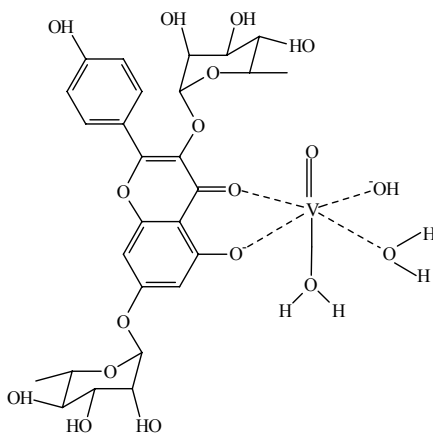


Figura 12: Curvas de distribuição de espécies do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em função de  $-\log[\text{H}^+]$  para uma solução contendo 0,05490 mmol kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e 0,02610 mmol de VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e força iônica  $\mu = 0,100$  mol.L<sup>-1</sup> (KCl).

As estruturas propostas que melhor representam a interação do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) (2:1) em pH 7,4 são mostradas na Figura 13.



(VOL<sub>2</sub>)



(VOH<sub>1</sub>L)

Figura 13: Estruturas propostas para as espécies VOL<sub>2</sub> e VOH<sub>1</sub>L, predominantes em pH fisiológico.

### 3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 3.3.1 Avaliação da atividade hipoglicêmica da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata*

##### 3.3.1.1 Efeito agudo da administração oral da fração *n*-butanólica em ratos normais

O uso popular das plantas como uma alternativa terapêutica no tratamento do Diabetes vem crescendo em todo o mundo. Este crescimento deve-se ao fato de que as substâncias encontradas nestas plantas possam servir como agentes hipoglicemiantes orais que mimetizam o efeito da insulina. Sendo assim, estas substâncias poderiam substituir as dolorosas injeções de insulina o que seria um alívio na vida dos diabéticos do tipo 1, minimizariam os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais no caso dos diabéticos do tipo 2 e também diminuiriam os elevados custos do tratamento para pessoas de baixa renda. No Brasil a espécie vegetal *Bauhinia forficata* é muito utilizada pela população. Porém, poucos estudos científicos comprovam sua atividade hipoglicêmica. Então com o objetivo de esclarecer esta atividade e propor o mecanismo de ação foram realizadas medidas glicêmicas em ratos normais, normais hiperglicêmicos e diabéticos.

Para a dosagem das medidas glicêmicas os animais podem estar tanto no estado alimentado como no estado de jejum, ambas condições apresentam vantagens específicas<sup>53</sup>. Neste trabalho todos os experimentos foram realizados com animais em jejum de mais ou menos 16 horas. Desta maneira conseguiu-se evitar a interferência na glicemia causada pelo alimento, como também o estímulo à secreção pancreática da insulina nos estudos onde foram utilizados ratos normais e normais hiperglicêmicos.

Estudos anteriores, demonstraram que as frações de acetato de etila (40 e 80 mg/Kg) e *n*-butanólica (40 e 80 mg/Kg) das folhas de *B. forficata* não apresentaram efeito hipoglicêmico significativo quando administradas oralmente em ratos diabéticos durante um tratamento sub-crônico (2, 3 e 4 semanas). Porém, nestes experimentos a fração *n*-butanólica sempre apresentou uma tendência em diminuir a glicemia<sup>54</sup>. Com base nestes resultados, a fração *n*-butanólica foi escolhida para ser avaliada durante um tratamento agudo (0 a 3 horas).



Além disso, o tratamento agudo foi escolhido baseado na literatura como modelo experimental pelas seguintes razões: (1) trabalhar com ratos diabéticos por um período crônico é muito complicado, pois há um alto índice de mortalidade dos animais; (2) há um gasto muito grande das frações e compostos.

O efeito das doses de 400, 500, 600 e 800 mg/Kg da fração *n*-butanólica de *Bauhinia forficata* na glicemia de ratos normais é mostrado na Figura 14. As doses de 500 e 600 mg/Kg foram efetivas em diminuir a glicemia de ratos normais. A dose de 500 mg/Kg apresentou uma queda de 20,7% nos níveis de glicose após 1 hora de tratamento e a dose de 600 mg/Kg apresentou efeito hipoglicêmico após 1 e 2 horas de tratamento, apresentando uma queda máxima de 21,3% na glicemia após 2 horas de tratamento. O efeito hipoglicêmico causado por ambas as doses desta fração em ratos normais pode estar relacionado com a estimulação da liberação de insulina pelas células  $\beta$ , pela ação da fração *n*-butanólica em tecidos alvos da insulina como por exemplo músculo e tecido adiposo (estimulando a captação de glicose), pela inibição da absorção de glicose pelo intestino ou ainda pela inibição da reabsorção da glicose pelos rins.

Os resultados obtidos com as doses de 500 e 600 mg/Kg em ratos normais são contrários aos resultados encontrados por Caricati-Neto e colaboradores (1985), Almeida & Agra (1986), Russo e colaboradores (1990) e Pepato e colaboradores (2002). Segundo Caricati-Neto, as frações aquosa (0,11 mg/g) e alcoólica (15,5  $\mu$ g/g) das folhas de *B. forficata* não alteraram significativamente a glicemia de ratos normais quando administradas via intraperitoneal<sup>11</sup>. Os autores Almeida & Agra observaram que o tratamento agudo da administração oral da dose única de 1000 mg/Kg do extrato etanólico das folhas de *B. forficata* em ratos normais não apresentou ação significativa na diminuição da glicemia<sup>55</sup>. Russo não encontrou diferenças estatísticas nos níveis de glicose e de insulina entre os grupos de pacientes normais que receberam o placebo (*Imperata brasiliensis*, “sapé”) e o chá das folhas de *B. forficata* durante um tratamento agudo (0 a 6 horas) e crônico (1 a 56 dias)<sup>12</sup>. E Pepato quando compara dois grupos de ratos normais (grupo tratado com chá de *B. forficata* e grupo controle) durante 34 dias de tratamento verifica que não há nenhuma diferença significativa entre estes dois grupos no que se refere à glicemia e a uréia na urina<sup>14</sup>, ele então sugere que o mecanismo de ação dos compostos que constituem este chá possivelmente seja diferente ao da insulina e das sulfoniluréias.

Estes resultados contraditórios descritos por estes autores em relação ao efeito hipoglicêmico da *Bauhinia forficata* em ratos normais podem estar relacionados aos seguintes fatores: diferentes doses utilizadas, método de preparação dos extratos e/ou frações (chá), tipos de extratos e/ou frações (aquoso, etanólico, butanólico) e a via de administração utilizada (via oral ou intraperitoneal).

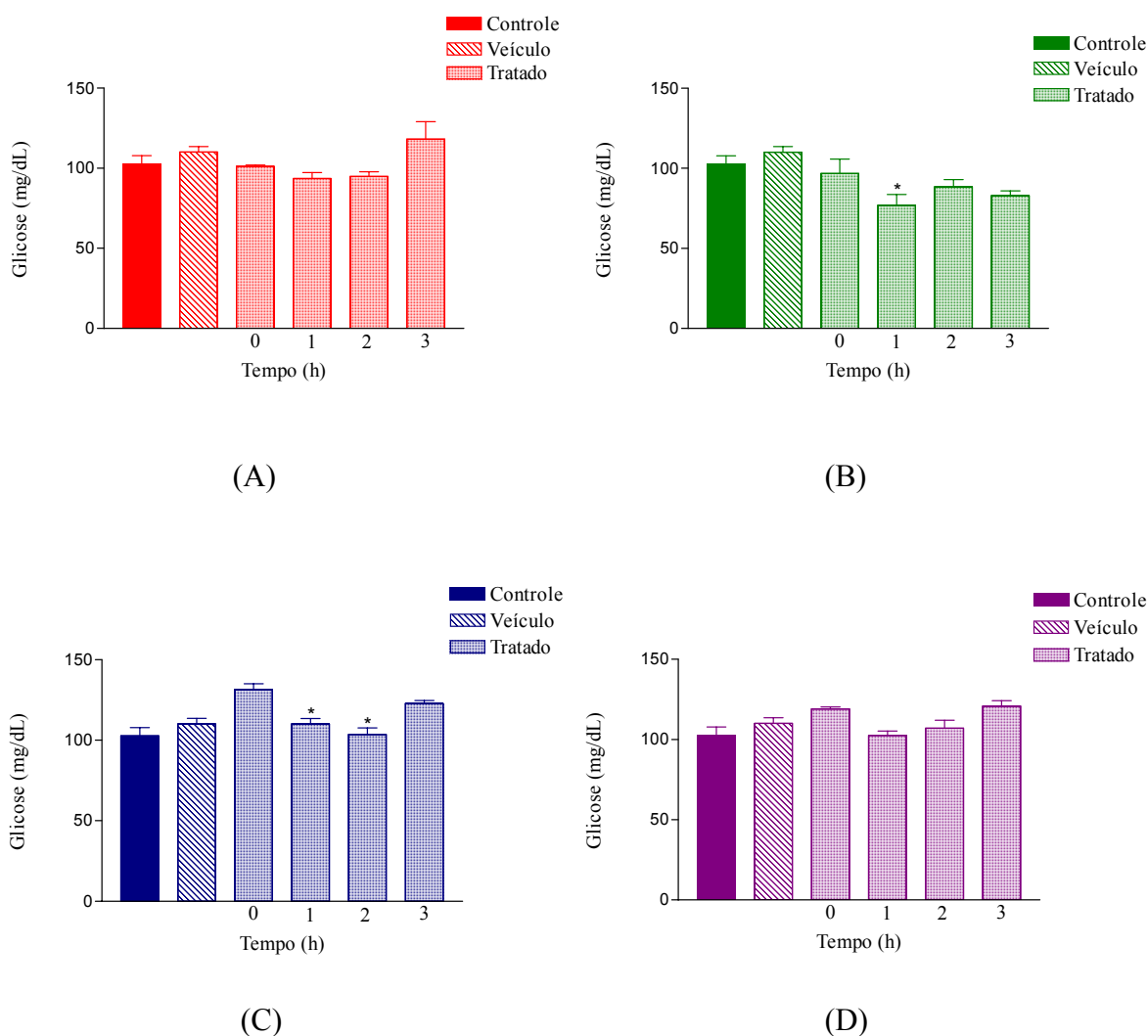


Figura 14: Efeito agudo da administração oral das diferentes doses da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* em ratos normais. (A) dose de 400 mg/Kg; (B) dose de 500 mg/Kg; (C) dose de 600 mg/Kg; (D) dose de 800 mg/Kg. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

### 3.3.1.2 Efeito agudo da administração oral da fração *n*-butanólica em ratos diabéticos

O Diabetes Mellitus Insulino Dependente (DMID) ou tipo 1 pode ser induzido em animais pelas seguintes técnicas: destruição química ou remoção cirúrgica das células  $\beta$  do pâncreas, pancreactomia, entre outras. Para a indução do Diabetes por destruição química as duas substâncias mais utilizadas são aloxana (AL) e streptozotocina (STZ). A aloxana é uma substância que provoca a destruição específica das células  $\beta$  do pâncreas através da produção de peróxido de hidrogênio o qual induz a fragmentação do DNA. Esta droga pode produzir modelos de diabéticos moderados ou severos dependendo da dose que ela é administrada e dependendo também da espécie, linhagem, sexo, idade e estado nutricional dos animais. Alguns autores preferem utilizar a STZ ao invés da AL pois esta primeira produz um diabético permanente e apresenta menor taxa de mortalidade quando comparada com a AL<sup>56</sup>. Porém ambas as drogas produzem hiperglicemia sendo que a AL tem um custo financeiro menor do que a STZ. Como neste trabalho, os experimentos foram realizados através do tratamento agudo (0 a 3 horas), utilizamos a AL.

Notou-se que, a administração de aloxana (60 mg/Kg) em ratos, produziu uma redução no peso corporal e um aumento significativo na glicemia após o terceiro dia da indução do Diabetes (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito da aloxana no peso corporal e na glicemia após o terceiro dia da indução do Diabetes<sup>a</sup>.

Grupo	Peso corporal (g)	Glicose (mg/dL)
Normal	189,5 $\pm$ 2,3	117,3 $\pm$ 2,3
Aloxana	163,1 $\pm$ 3,0	330,5 $\pm$ 11,9 <sup>b</sup>
(60 mg/Kg)		

<sup>a</sup> Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M de experimentos realizados em duplicatas (n = 10 para cada grupo).

<sup>b</sup> Significativo para  $p \leq 0.05$ .

A Figura 15 mostra o efeito das doses de 400, 600 e 800 mg/Kg da fração *n*-butanólica de *Bauhinia forficata* na glicemia de ratos diabéticos. Todas as doses apresentaram efeito hipoglicêmico. A dose de 400 mg/Kg apresentou uma queda de 16,0% na glicemia após 1 hora de tratamento. A dose de 600 mg/Kg reduziu a glicemia após 1 e 2 horas de tratamento, apresentando uma queda máxima de 20,4% nos níveis glicêmicos após 1 hora de tratamento. E a dose de 800 mg/Kg apresentou uma diminuição na glicemia durante todo o período estudado, demonstrando uma queda hipoglicêmica em torno de 30,0% após 1 e 2 horas de tratamento.

Sabe-se que quando os níveis glicêmicos estão elevados o próprio organismo tende a normalizar estes níveis através de três principais vias: (1) estimular a captação de glicose pelos tecidos periféricos (músculo e tecido adiposo); (2) alterar o metabolismo da insulina (diminuindo a degradação da insulina pelo fígado ou estimulando a secreção de insulina); (3) inibir a reabsorção de glicose pelos rins o que resulta na eliminação da glicose pela urina.

O efeito hipoglicêmico das diferentes doses da fração *n*-butanólica em ratos diabéticos indica que nesta fração estão contidos compostos que provavelmente atuam estimulando a utilização da glicose pelos tecidos periféricos.

Os resultados das diferentes doses da fração *n*-butanólica em ratos diabéticos estão de acordo com os resultados encontrados por Juliani (1929, 1931 e 1941), Caricati-Neto e colaboradores (1985) e Pepato e colaboradores (2002). Carmela Juliani foi a primeira autora a descrever a atividade hipoglicêmica da *B. forficata*, segundo os experimentos em cães e coelhos submetidos à hiperglicemia adrenalítica e pancreactomizados, ela observou que esta espécie vegetal continha compostos capazes de diminuir a glicemia<sup>10</sup>. Caricati-Neto observou mudanças significativas na glicemia quando utilizou a fração aquosa (0,11 mg/g) das folhas de *B. forficata* em ratos diabéticos induzidos com aloxana, porém ele utilizou a via intraperitoneal<sup>11</sup>. Ainda que efetivo, este tratamento tem a desvantagem da utilização de repetidas injeções. Pepato, verificou que durante um tratamento crônico (31 dias) o grupo diabético tratado com chá das folhas de *B. forficata* mostrou uma redução significativa na glicemia e nos níveis de glicose e uréia na urina em relação ao grupo diabético controle<sup>14</sup>. Ele então sugere que este chá possa conter constituintes químicos capazes de inibir as insulinas.

Os resultados deste trabalho são apenas contrários aos resultados encontrados por Russo e colaboradores (1990), que relataram que não houve diferença significativa nos níveis

de glicose e de insulina entre os grupos de pacientes diabéticos do tipo 2 que receberam o placebo (*Imperata brasiliensis*, “sapé”) e o chá das folhas de *B. forficata* durante um tratamento agudo (0 a 6 horas) e crônico (1 a 56 dias)<sup>12</sup>.

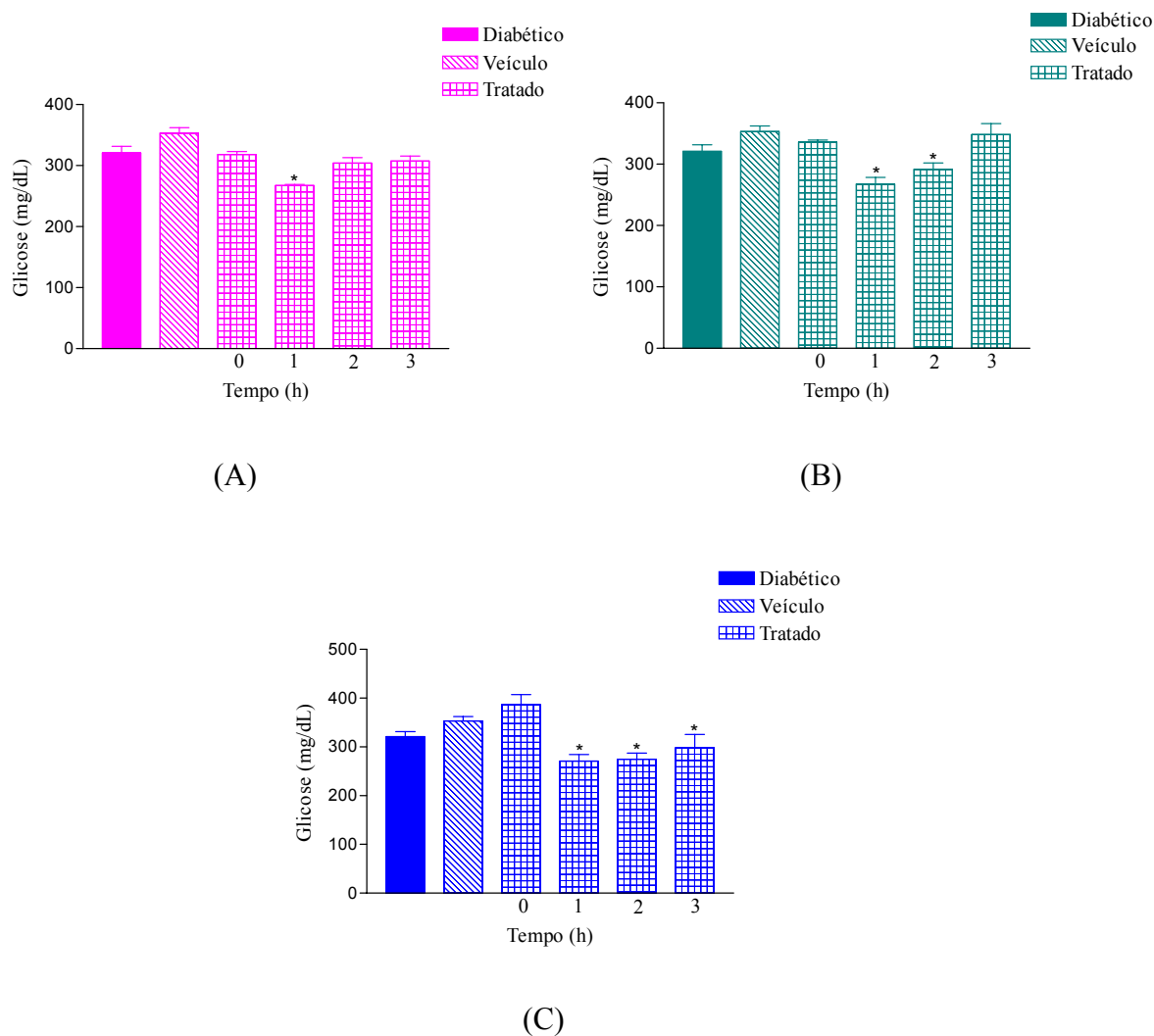


Figura 15: Efeito agudo da administração oral das diferentes doses da fração *n*-butanólica de *Bauhinia forficata* em ratos diabéticos. (A) dose de 400 mg/Kg; (B) dose de 600 mg/Kg; (C) dose de 800 mg/Kg. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

### 3.3.1.3 Efeito agudo da fração *n*-butanólica na curva de tolerância à glicose

A curva de tolerância à glicose é um teste muito utilizado no diagnóstico do Diabetes. O paciente em jejum recebe uma dose de glicose oralmente e as concentrações de glicose no sangue são determinadas em intervalos de 30 minutos durante um período de 3 horas. Em indivíduos normais, a glicemia é inicialmente aumentada, atinge um pico máximo e posteriormente volta aos valores normais<sup>57</sup>. Este é um método simples, econômico e reproduzível que nos permite verificar se frações ou compostos isolados de plantas são capazes de inibir a absorção de glicose pelo intestino e/ou estimular a secreção de insulina.

Na curva de tolerância à glicose, mostrada na Figura 16, podemos observar que após 30 minutos da administração oral da glicose (4g/Kg) a glicemia quase dobrou, caracterizando o pico de absorção de glicose neste tempo para ratos normais. Os níveis hiperglicêmicos foram mantidos significativamente altos em relação ao tempo zero dos 15 aos 90 minutos e, voltando aos valores basais aos 180 minutos.

A dose de 800 mg/Kg da fração *n*-butanólica de *Bauhinia forficata* foi escolhida para ser testada na curva de tolerância à glicose pois foi a dose que apresentou melhor efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos. O efeito desta dose na curva de tolerância à glicose também é mostrado na Figura 16, e o perfil da curva de tolerância não foi alterado em nenhum momento.

Estes resultados são semelhantes aos resultados encontrados por Caricati-Neto e colaboradores (1985) que demonstraram que a fração aquosa (0,11 mg/g) de *B. forficata* não foi capaz de alterar a curva de tolerância à glicose<sup>11</sup>.

Considerando o efeito hipoglicêmico da fração *n*-butanólica em ratos normais e diabéticos, anteriormente apresentados neste trabalho, juntamente com os resultados obtidos na curva de tolerância à glicose sugerimos que nesta fração estejam presentes compostos que provavelmente atuem estimulando o consumo de glicose pelos tecidos periféricos (músculo e tecido adiposo); inibem o catabolismo da insulina (inibindo as insulinasas) e/ou inibem a reabsorção de glicose pelos rins. E descartamos a possibilidade de que os compostos contidos nesta fração estejam atuando inibindo a absorção da glicose pelo intestino.

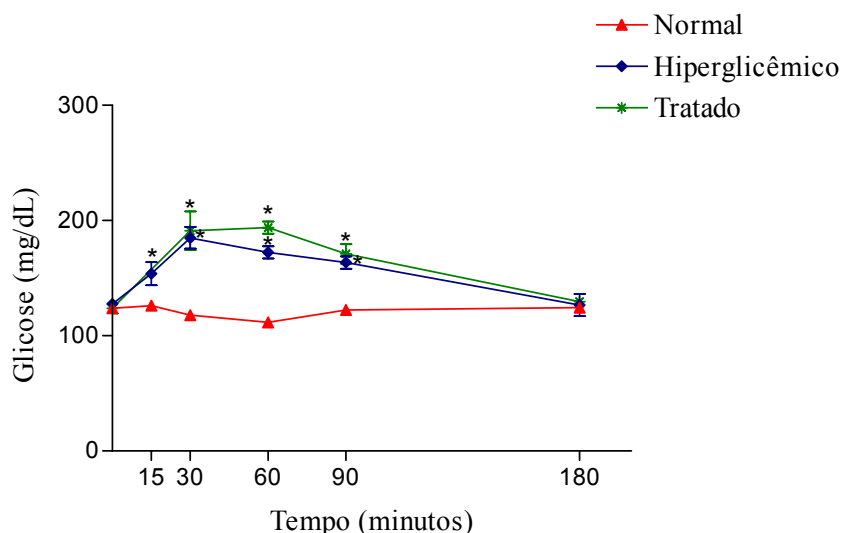


Figura 16: Efeito da administração oral da dose 800 mg/Kg da fração *n*-butanólica de *Bauhinia forficata* na curva de tolerância à glicose. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo normal.

### 3.3.2 Avaliação da atividade hipoglicêmica do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo isolado da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata*

#### 3.3.2.1 Efeito agudo da administração oral do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais

A fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata* foi submetida ao fracionamento cromatográfico onde resultou no isolamento de alguns compostos como é mostrado no item 3.1. dos Resultados e Discussão. Porém, apenas com o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, constituinte majoritário desta fração, os experimentos foram realizados *in vivo*. Lembrando que quando se trata de isolamento de compostos naturais, pequenas quantidades são obtidas (em torno de miligramas), o que delimita os ensaios biológicos, os quais exigem grandes quantidades (em torno de gramas) para as curvas de tempo e dose-resposta. Também se

observa na literatura que quando os ensaios biológicos são realizados com substâncias puras, doses menores são exigidas. Por este motivo, as doses do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo usadas nos experimentos *in vivo* foram menores do que as doses utilizadas com a fração *n*-butanólica.

Na Figura 17 é mostrado o efeito das doses de 50, 100 e 200 mg/Kg do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais. Apenas a dose mais alta do composto apresentou uma queda de 23,7% na glicemia após 1 hora de tratamento. O efeito hipoglicêmico do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais pode estar relacionado com a estimulação da liberação de insulina pelas células  $\beta$ , pela ação do composto em tecidos alvos da insulina (músculo e tecido adiposo) estimulando a captação de glicose, pela inibição da absorção de glicose no intestino ou ainda pela inibição da reabsorção da glicose pelos rins.

No entanto, como nosso maior interesse é na ação hipoglicêmica do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, dedicamos esforços no estudo em animais diabéticos utilizando as mesmas doses do composto.



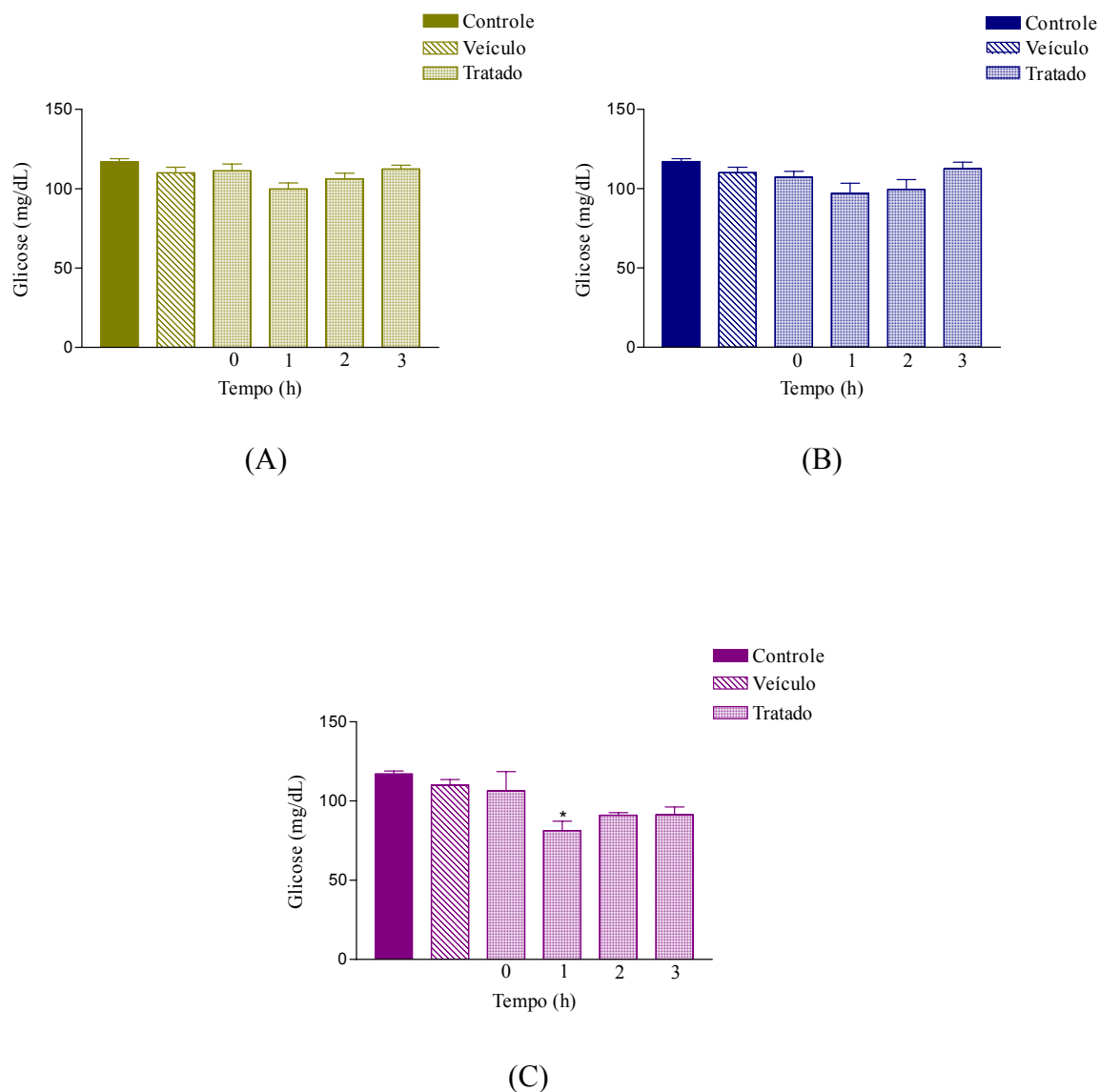


Figura 17: Efeito agudo da administração oral das diferentes doses do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais. (A) dose de 50 mg/Kg; (B) dose de 100 mg/Kg; (C) dose de 200 mg/Kg. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n = 6 para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

### 3.3.2.2 Efeito agudo da administração oral do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos diabéticos

O efeito hipoglicêmico das doses de 50, 100 e 200 mg/Kg do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos diabéticos é mostrado na Figura 18. Todas as doses apresentaram uma queda significativa na glicemia. A dose de 50 mg/Kg apresenta uma diminuição na glicemia após 1 e 2 horas de tratamento (queda máxima de 13,3% após 1 hora de tratamento). E as doses de 100 e 200 mg/Kg apresentaram efeito hipoglicêmico durante todo o período estudado. Sendo que as doses de 100 e 200 mg/Kg exibiram uma queda máxima de 21,5% e 22,0%, respectivamente. O efeito hipoglicêmico causado por todas as doses do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos diabéticos indica que este composto provavelmente atua estimulando a captação de glicose pelos tecidos periféricos; regula o metabolismo da insulina (preferencialmente inibindo as insulinasas) ou ainda seja capaz de inibir a reabsorção da glicose pelos rins. Os resultados obtidos com o composto foram mais expressivos que os obtidos com a fração. Esta é a primeira vez que o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, constituinte majoritário da fração *n*-butanólica da *B.forficata*, é descrito na literatura como agente hipoglicêmico.

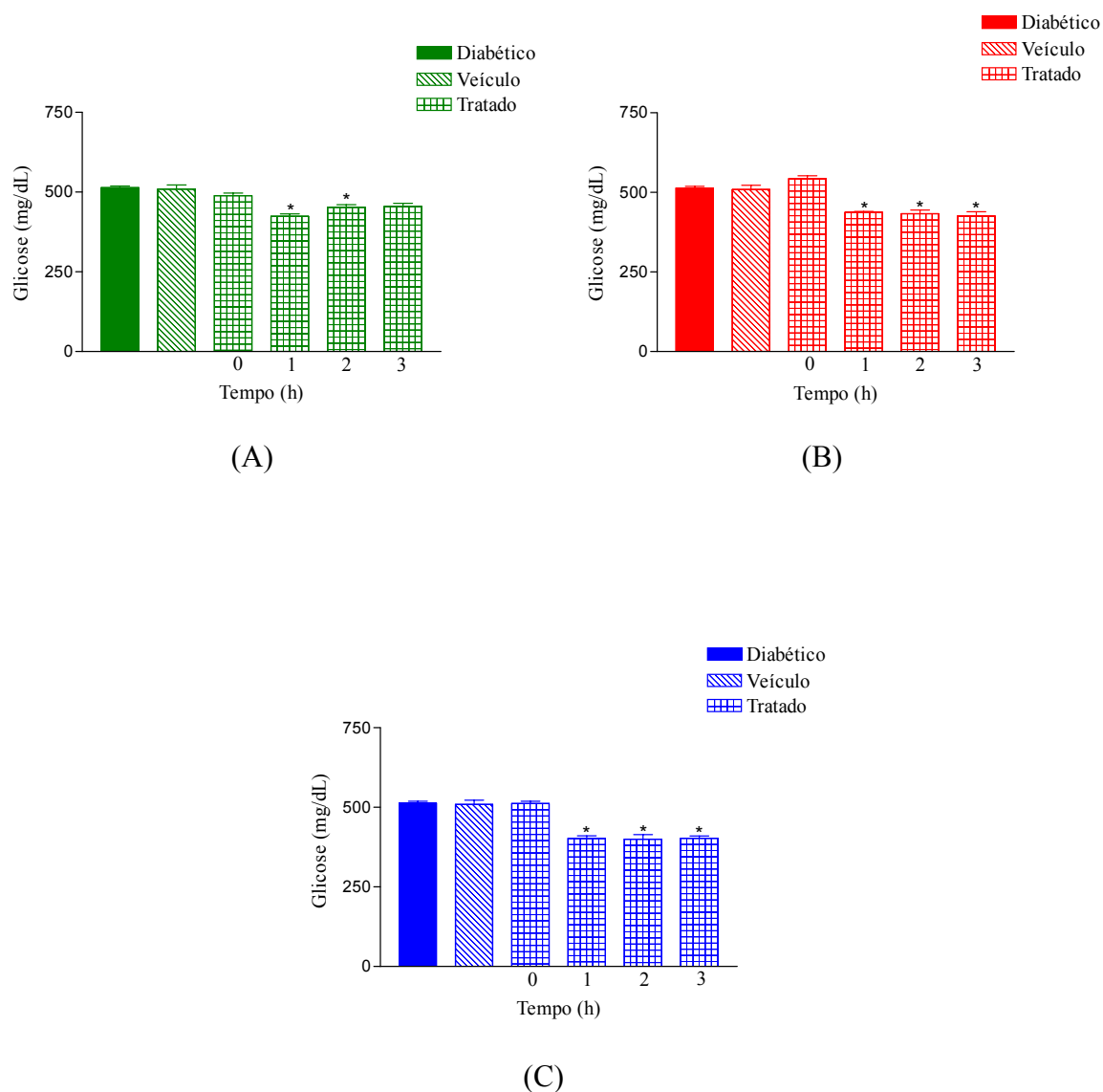


Figura 18: Efeito agudo da administração oral do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos diabéticos. (A) dose de 50 mg/Kg; (B) dose de 100 mg/Kg; (C) dose de 200 mg/Kg. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

### 3.3.2.3 Efeito agudo do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo na curva de tolerância à glicose

A dose de 100 mg/Kg do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo foi escolhida para ser testada na curva de tolerância a glicose porque esta apresentou uma diminuição na glicemia durante todo o período estudado em ratos diabéticos e também por ter apresentado a mesma queda percentual do que a dose do 200 mg/Kg do composto.

Na Figura 19 é mostrado o efeito do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (100 mg/Kg) na curva de tolerância à glicose. Esta dose não alterou a absorção da glicose pelo intestino. O tolbutamida (classificado como uma sulfoniluréia) é um conhecido agente hipoglicemiante oral que atua estimulando a liberação de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas. A dose de 100 mg/Kg do tolbutamida também foi testada na curva de tolerância à glicose para que fosse possível uma comparação com o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo. Os resultados mostraram que o efeito hipoglicêmico do composto não se dá preferencialmente pelo estímulo da liberação de insulina como observado para o tolbutamida.

Os resultados do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo em ratos normais, diabéticos e na curva de tolerância a glicose reforçam três aspectos: (1) a ação hipoglicêmica do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo não é através da inibição da absorção da glicose pelo intestino; (2) o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo atua preferencialmente em vias do metabolismo da glicose que dependem da ação da insulina ou estimula o consumo de glicose em tecidos insulino-dependentes e (3) o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo pode estar atuando também no transporte da glicose.

Estes estudos são de grande importância para o esclarecimento da atividade hipoglicêmica da *B.forficata* porém, estudos adicionais como por exemplo, medidas da insulina no soro, verificação da glicose na urina, estímulo no transporte de glicose no músculo, medidas da atividade da insulinase seriam de extrema relevância para a elucidação do mecanismo de ação.

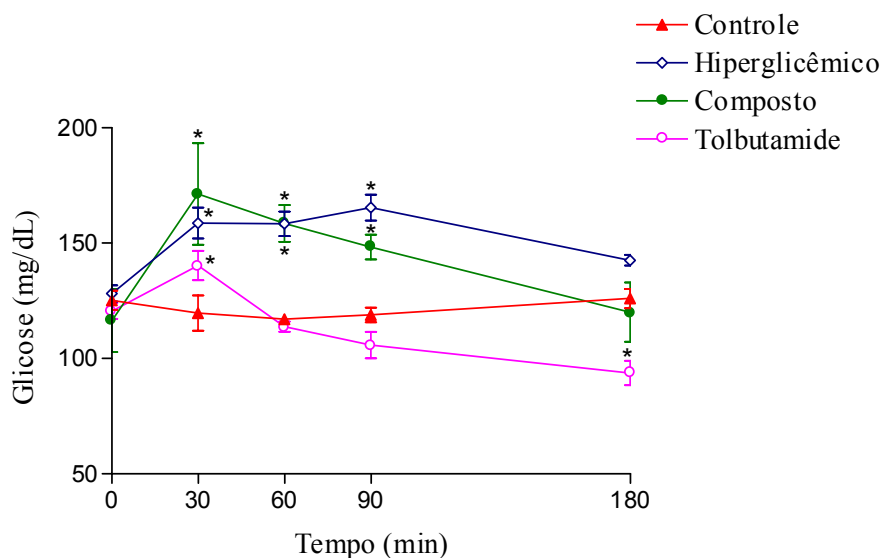


Figura 19: Efeito da administração oral da dose de 100 mg/Kg do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo na curva de tolerância à glicose. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 3.3.3 Avaliação da atividade hipoglicêmica do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV)

#### 3.3.3.1 Efeito agudo da administração oral do vanádio(IV) em ratos diabéticos

O vanádio é um elemento traço, amplamente distribuído na natureza, no entanto, a função fisiológica específica deste metal em mamíferos ainda não é conhecida. Porém, muitas evidências sugerem que o vanádio atue semelhantemente a insulina. Recentemente, íons de vanádio, como por exemplo vanadato ( $V^V$ ) e vanadil ( $V^{IV}$ ), foram descritos como substâncias hábeis em diminuir a glicemia de ratos diabéticos<sup>42</sup>.

Há uma preferência por parte dos pesquisadores em trabalhar com o vanádio(IV), pois neste estado de oxidação ele é conhecido por ser menos tóxico do que o vanádio(V) e também

por ser encontrado principalmente nesta forma química nos tecidos e órgãos. Por estas razões o vanádio(IV) foi utilizado em nossos experimentos<sup>42</sup>.

Em 1989, Meyeroitch e colaboradores demonstraram que o vanádio(V) quando administrado na água de beber (0,6 mg/mL) por 5 dias apresentou uma melhora na glicemia de ratos diabéticos<sup>58</sup>. Segundo Thompson e colaboradores (1993) o vanádio(IV) apresentou uma diminuição na glicemia de ratos diabéticos quando administrado na água de beber (0,5 a 1,2 g/L) por um período de 8 a 12 semanas<sup>36</sup>. Por outro lado, estudos feitos por Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que o sulfato de vanadila (0,55 mmol/Kg) não apresentou efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrado oralmente durante tratamento agudo (0 a 25 horas)<sup>59</sup>.

A escolha da dose de 0,0146 mmol (ou 0,0607 mol.L<sup>-1</sup>) de vanádio(IV) foi feita com o objetivo de posteriormente compararmos com o efeito hipoglicêmico do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV). Uma vez que o complexo foi preparado na razão 2:1 ligante:metal (0,0294 mmol kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo:0,0146 mmol de vanádio).

A Figura 20 mostra o efeito agudo da administração oral da dose de 0,0146 mmol (ou 0,0607 mol.L<sup>-1</sup>) de vanádio(IV) em ratos diabéticos. Esta dose não foi significativa em diminuir a glicemia. Estes resultados estão em acordo com os resultados encontrados por Yuen e colaboradores (1997)<sup>56</sup>. No entanto, nossos resultados podem ser atribuídos a três fatores: (1) a dose de vanádio utilizada é muito baixa quando comparada com doses utilizadas por outros autores; (2) o limiar de absorção do vanádio é muito baixo quando administrado oralmente, sendo apenas 2% absorvido no tubo gastrointestinal<sup>26,39,59</sup> e (3) pela possibilidade do vanádio ter se ligado fortemente com proteínas circulantes no sangue, as quais não o disponibilizaram para a função biológica<sup>38</sup>. Na literatura é descrito que a maioria dos metais encontrados no organismo não se encontram na forma livre mas sim complexados com proteínas o que facilita o transporte na corrente sanguínea e a captação pelas células. Porém, este mecanismo de transporte e ação biológica a nível celular ainda não está bem entendido.

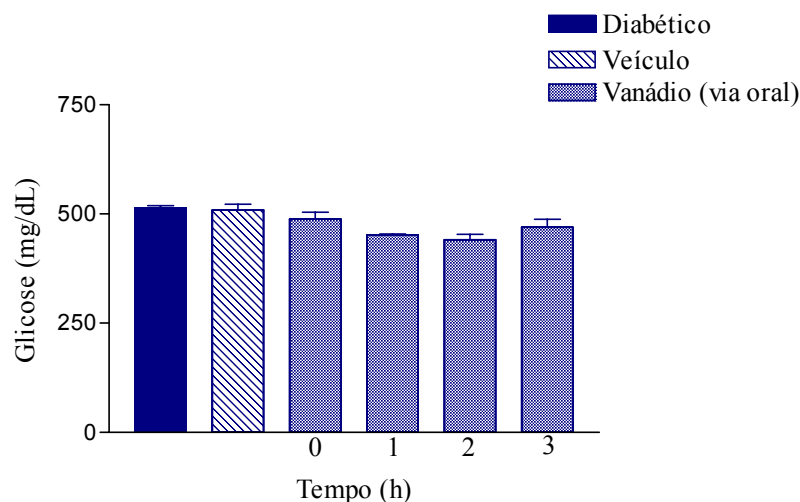


Figura 20: Efeito agudo da administração oral de  $0,0607 \text{ mol.L}^{-1}$  (ou  $0,0146 \text{ mmol}$ ) de vanádio(IV) em ratos diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo).

Ainda que, vários estudos com o vanádio ( $V^V$  e  $V^{IV}$ ) são encontrados na literatura o mecanismo exato *in vivo* permanece incerto. Porém, o que se sabe é que nos dois modelos experimentais de Diabetes (tipo 1 e tipo 2) o vanádio diminui a glicemia sem aumentar os níveis de insulina, indicando que o local de ação dele está nos tecidos alvos da insulina. As cinco possibilidades de ação do vanádio seriam: (1) estimular a fosforilação do receptor da insulina; (2) estimular o  $V_{\text{máx}}$  do transportador de glicose; (3) estimular a síntese da proteína transportadora de glicose; (4) estimular a síntese de glicogênio e (5) inibir a fosfatase que age no substrato do receptor<sup>60</sup>.

### 3.3.3.2 Efeito agudo da administração oral do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos

Com o objetivo de melhorar a absorção dos sais de vanádio (vanadato ( $V^V$ ) e vanadil ( $V^{IV}$ )), no tubo gastrointestinal, muitos pesquisadores complexaram o vanádio com substâncias orgânicas, o que acaba favorecendo também o uso de doses menores, evitando assim possíveis efeitos tóxicos, uma vez que estes efeitos aparecem com o uso de doses elevadas (0,20 a 1,0 mg/mL)<sup>61</sup>.

Estudos feitos por Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que os complexos de vanádio(IV) ( $VO(ma)_2$ , e  $VO(ka)_2$  (0,55 mmol/Kg)) apresentaram efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrados via oral durante tratamento agudo (0 a 25 horas). O complexo  $[VO(ma)_2]^-$  apresentou uma queda na glicemia após 4 e 6 horas de tratamento. Enquanto que os complexos,  $VO(ma)_2$  e  $VO(ka)_2$ , apresentaram uma redução marcante na glicemia até 12 horas depois do tratamento. O efeito hipoglicêmico do  $VO(ma)_2$  se prolongou até 24 horas após o tratamento. Estes estudos mostraram também que o sulfato de vanadila (0,55 mmol/Kg) administrado oralmente não apresentou efeito hipoglicêmico durante este período de tratamento. Estes resultados evidenciam que os complexos são mais potentes do que o vanádio(IV) livre<sup>59</sup>.

Segundo Woo e colaboradores (1999) os complexos, bis(maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV) (0,60 mmol/Kg) e o bis(N',N'-dimetilbiguanidato)oxovanádio(IV) ( $VO(metf)_2$ ) (0,60 mmol/Kg), demonstraram efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrados oralmente durante um tratamento agudo (72 horas)<sup>39</sup>.

Estudos feitos por Debbie C.Crans (2000) demonstraram que o  $VOSO_4$  (26 mg/Kg) e os complexos de vanádio(IV) tais como:  $VO(acaac)_2$  (13 mg/Kg),  $VO(Et-acaac)_2$  (17 mg/Kg) e  $VO(malto)_2$  (18 mg/Kg) dados na água de beber apresentaram uma diminuição na glicemia de ratos diabéticos tratados por 12 semanas. No entanto os complexos  $VO(acaac)_2$  e  $VO(Et-acaac)_2$  foram tão efetivos em diminuir a glicemia quanto o  $VO(malto)_2$  e os três complexos foram mais efetivos que o  $VOSO_4$ <sup>62</sup>. Segundo Sakurai e colaboradores (1998) o complexo bis(sarcosina-N-ditiocarbonato)oxovanádio(IV) ( $VO(SAD)$ ) (196  $\mu$ mol/Kg) foi efetivo em diminuir a glicemia de ratos diabéticos durante 12 dias de tratamento<sup>42</sup>.



Apoiados nestes estudos complexamos o kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo com o vanádio(IV). A dose de 100 mg/Kg do composto foi escolhida pois apresentou uma queda de 22,1% na glicemia de ratos diabéticos como foi mostrado no item 3.3.2.2 e também utilizando esta dose teríamos um menor gasto do composto.

A Figura 21 mostra o efeito agudo da administração oral da dose de 100 mg/Kg (0,0587 mol.L<sup>-1</sup> ou 0,0294 mmol) do complexo (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV)) em ratos diabéticos. O complexo administrado oralmente não foi efetivo em diminuir a glicemia. Com base na curva de distribuição das espécies, podemos dizer que em p[H] ácido que é o caso do estômago, não há formação de complexo. Porém, estudos farmacocinéticos detalhados da absorção do vanádio, assim como, dos níveis séricos do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) merecem investigações adicionais. Com os resultados obtidos até o presente momento, entendemos que para garantirmos a integridade do complexo em todo o tubo digestivo e a continuidade do efeito hipoglicêmico é necessário estudar o microencapsulamento e a liberação deste complexo a nível celular.

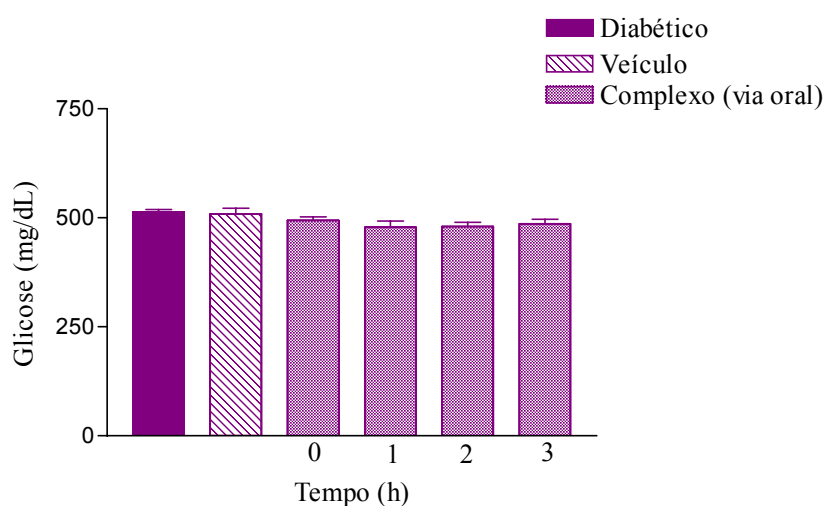


Figura 21: Efeito agudo da administração oral da dose de 100 mg/Kg (0,0587 mol.L<sup>-1</sup> ou 0,0294 mmol) do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos.

Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n = 6 para cada grupo).

### 3.3.3.3 Efeito agudo da administração intraperitoneal do vanádio(IV) em ratos diabéticos

Como foi mostrado no item 3.3.3.1, o vanádio ( $V^V$  e  $V^{IV}$ ) é largamente usado como uma alternativa no tratamento do Diabetes. Porém ele pode ser administrado tanto oralmente como intraperitonealmente. A via intraperitoneal apresenta a vantagem do vanádio e de seus complexos entrarem direto na corrente sanguínea, sem passar pelo p[H] ácido do estômago e sem o risco de serem excretados, no entanto, esta via apresenta a desvantagem de proporcionar o desconforto das dolorosas injeções.

Figura 22 mostra o efeito agudo da administração intraperitoneal de  $0,0607 \text{ mol.L}^{-1}$  (ou  $0,0146 \text{ mmol}$ ) de vanádio(IV) em ratos diabéticos. O vanádio quando administrado intraperitonealmente apresenta efeito hipoglicêmico marcante durante todo o tempo estudado. Esta dose de vanádio(IV) apresenta uma queda máxima de 27,9% nos níveis de glicose após 3 horas de tratamento. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Tsuji e colaboradores (1996). Tsuji demonstrou que o vanádio(IV) ( $10 \text{ mg/Kg}$ ) administrado intraperitonealmente reduz a glicemia de ratos diabéticos durante um tratamento de 15 dias<sup>35</sup>.

Resultados contrários foram encontrados por Willsky e colaboradores (2001) e Yuen e colaboradores (1997). Segundo Willsky e colaboradores (2001) o sulfato de vanadila ( $0,1 \text{ mmol/Kg}$ ) administrado intraperitonealmente durante um tratamento agudo (72 horas) não apresentou redução na glicemia de ratos diabéticos. O autor sugere que possivelmente o sal de vanádio tenha se ligado rapidamente com as proteínas do plasma e a ligação formada entre o vanádio e a proteína seja tão forte que o vanádio não esteja disponível para a função biológica<sup>38</sup>. E Yuen e colaboradores (1997), demonstraram que o sulfato de vanadila ( $0,55 \text{ mmol/Kg}$ ) não apresenta efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrado intraperitonealmente durante o tratamento agudo (0 a 25 horas)<sup>59</sup>.

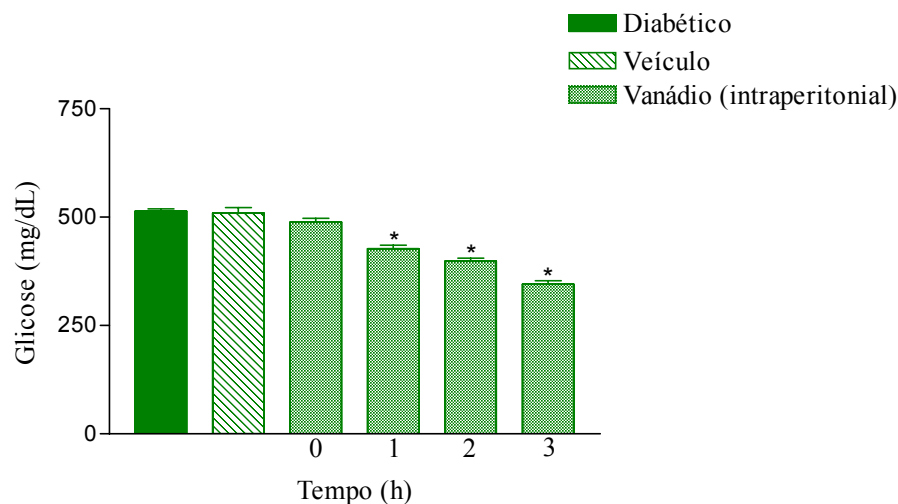


Figura 22: Efeito agudo da administração intraperitoneal de  $0,0607 \text{ mol.L}^{-1}$  (ou  $0,0146 \text{ mmol}$ ) de vanádio (IV) em ratos diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

#### 3.3.3.4 Efeito agudo da administração intraperitoneal do complexo kenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos

Estudos feitos por Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que o sulfato de vanádio(IV) ( $0,06 \text{ mmol/Kg}$ ) e o complexo  $[\text{VO}(\text{ma})_2]^-$  ( $0,06 \text{ mmol/Kg}$ ) não apresentaram efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrados intraperitonealmente durante tratamento agudo (0 a 25 horas). Os complexos,  $\text{VO}(\text{ma})_2$ , e  $\text{VO}(\text{ka})_2$  ( $0,06 \text{ mmol/Kg}$ ), apresentaram uma redução na glicemia após 2 horas de tratamento e esta diminuição se prolongou até 12 horas de tratamento. Estes resultados sugerem que o complexo neutro facilita a entrada destes nas células<sup>59</sup>.

Segundo Sakurai e colaboradores (1998) o complexo ditiocarbonato-vanadil ( $\text{VO-PYD}$ ) ( $198 \text{ } \mu\text{mol/Kg}$ ) apresentou efeito hipoglicêmico melhor quando administrado intraperitoneal do que quando administrado oralmente e sugere que o tipo de coordenação  $\text{VO}(\text{S}_4)$  também serve como modelo para um provável agente hipoglicemiante<sup>42</sup>.

Segundo Willsky e colaboradores (2001) quando o complexo bismaltolato oxovanádio e o sulfato de vanadila foram administrados intraperitonealmente durante um tratamento agudo, apenas o complexo apresentou uma redução na glicemia de ratos diabéticos. O autor sugere que possivelmente o sal de vanádio tenha se ligado rapidamente com as proteínas do plasma e a ligação formada entre o vanádio e a proteína seja tão forte que o vanádio não esteja disponível para a função biológica. Indicando que se o ligante for adequado para administração do vanádio se pode diminuir a formação de complexos com outros ligantes em circulação, desta forma aumentaria a bio-disponibilidade do vanádio no plasma<sup>38</sup>.

A Figura 23 mostra o efeito agudo da administração intraperitoneal da dose de 100 mg/Kg ( $0,0587 \text{ mol.L}^{-1}$  ou 0,0294 mmol) do complexo (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV)) em ratos diabéticos. O complexo apresenta efeito hipoglicêmico durante todo o tempo estudado. A queda máxima na glicemia é de 16,9% após 3 horas de tratamento. Este efeito quando comparado ao do vanádio sozinho é menos acentuado. Como se pode observar na curva de distribuição das espécies, pode-se notar que duas espécies são formadas em p[H] fisiológico,  $\text{VOL}_2$  e  $\text{VOH}_{11}\text{L}$ . Sugere-se que a espécie  $\text{VOH}_{11}\text{L}$ , seja a espécie ativa, pois segundo a literatura<sup>62</sup>, os complexos de vanádio ativos devem gerar uma espécie estável e com sítios de coordenação livre para que se possam ligar aos receptores como por exemplo, os transportadores de glicose e outras enzimas. Porém, neste estudo, o complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) não potencializou o efeito hipoglicêmico do vanádio sozinho.

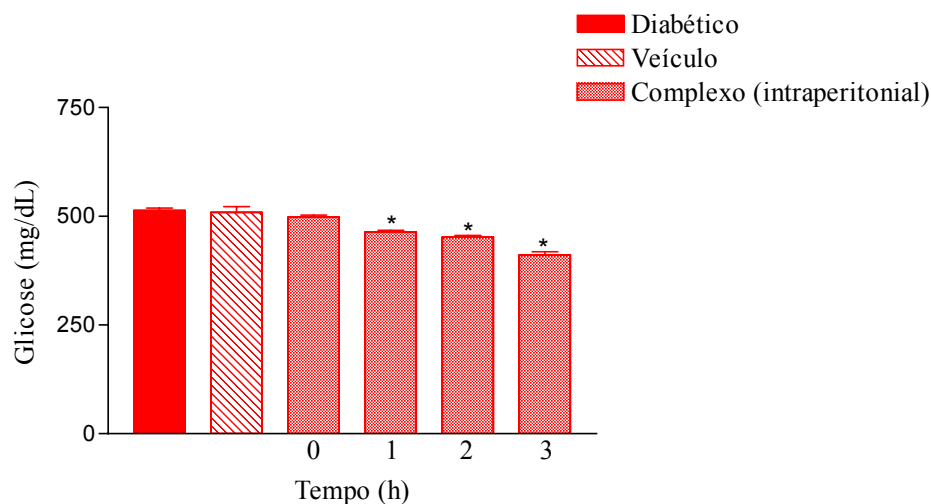


Figura 23: Efeito agudo da administração intraperitoneal da dose de 100 mg/Kg (0,0587 mol.L<sup>-1</sup> ou 0,0294 mmol) do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n = 6 para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

Ambos, sais e complexos de vanádio, são demonstrados como fortes candidatos em imitar os efeitos metabólicos da insulina nos dois modelos de Diabetes. Fato este que encoraja muitos pesquisadores como: Químicos e Bioquímicos a investigar as ações biológicas. Porém, encontrar uma relação clara entre a estrutura do complexo e a atividade hipoglicêmica ainda é muito difícil, tendo em vista a inter-relação entre muitos fatores importantes que envolvem físico-química e características fisiológicas como por exemplo, estabilidade, carga eletrônica em pH fisiológico, hidrofiliidade ou lipofiliidade, disponibilidade para absorção gastrointestinal, distribuição em órgãos e células e também a toxicidade. Entretanto, a elucidação do mecanismo de ação do vanádio e dos complexos é uma tarefa essencial, urgente e de grande importância para o desenvolvimento de melhores agentes hipoglicemiantes.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE VEGETAL *BAUHINIA FORFICATA* LINK

Dos resultados obtidos do estudo fitoquímico da espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link podemos concluir que além do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e do  $\beta$ -sitosterol, previamente descritos como principais constituintes químicos, foram isolados e identificados pela primeira vez nesta espécie mais cinco flavonóides: kaenferol, quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1"-6")-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo, quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1"-6")-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo e kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo. Sendo assim, podemos afirmar que do ponto de vista quimiotaxonômico a *B. forficata* pode ser classificada pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados, além de fitoesteróis.

### 4.2 ESTUDO DE EQUILÍBRIO QUÍMICO DO KAENFEROL-3,7-O-( $\alpha$ )-DIRAMNOSÍDEO-VO(IV)

O estudo potenciométrico do sistema kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) (2:1) revela que ocorre interações do VO(IV) com kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e as espécies que se formam são  $VOL^+$ ,  $VOL_2$ ,  $VOH_{.1}L$  e  $VOH_{.1}L_2$ . Este estudo nos permite saber quais são as espécies que se formam nos diferentes valores de p[H] (2 a 11). Em p[H] fisiológico temos a formação de duas espécies,  $VOL_2$ ,  $VOH_{.1}L$ .

### 4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

#### 4.3.1 Efeito hipoglicêmico da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata*

A fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata* apresenta efeito hipoglicêmico tanto em ratos normais como em ratos diabéticos e não interfere na absorção de glicose no intestino. Com base nestes resultados sugerimos que a fração *n*-butanólica contém compostos que apresentam atividade hipoglicêmica.

#### 4.3.2 Efeito hipoglicêmico do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo isolado da fração *n*-butanólica das folhas de *Bauhinia forficata*

O kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo, composto majoritário da fração *n*-butanólica das folhas de *B. forficata*, apresenta efeito hipoglicêmico em ratos normais e diabéticos. E seu mecanismo de ação não se dá pela inibição da absorção da glicose no intestino, nem preferencialmente pelo estímulo da liberação de insulina, mas, possivelmente através do estímulo do consumo de glicose pelos tecidos alvos da insulina (músculo e tecido adiposo). Desse modo, propomos uma hipótese do modo de ação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo como agente hipoglicêmico (Figura 24).

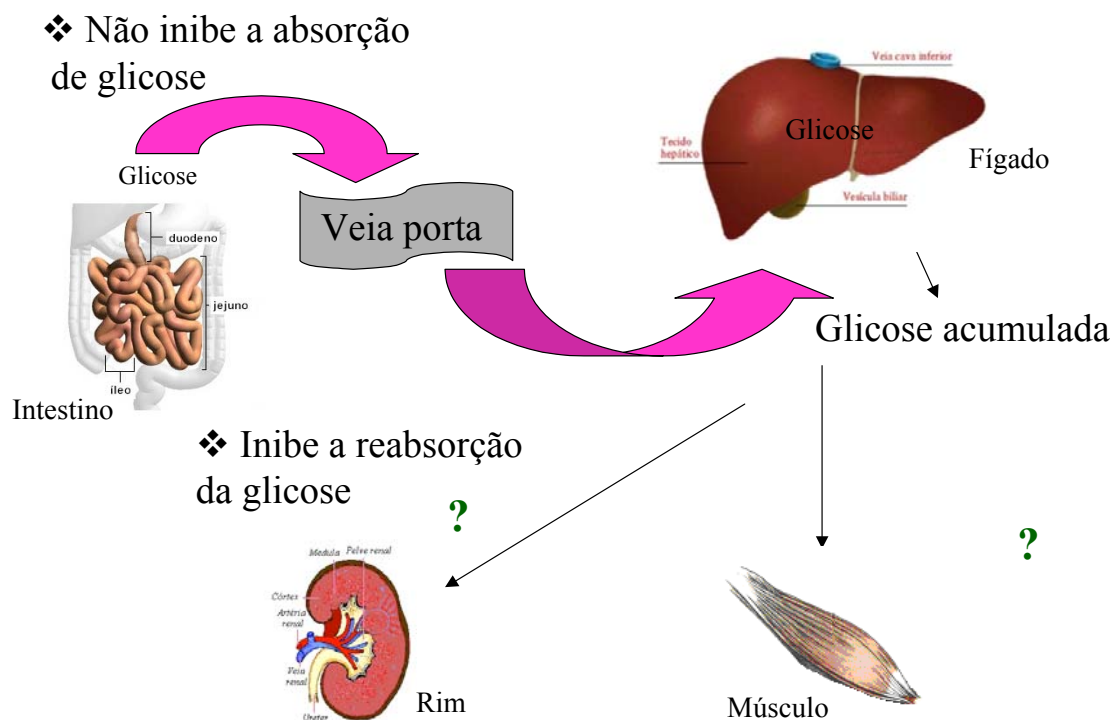


Figura 24: Esquema da hipótese do modo de ação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo como agente hipoglicêmico.

#### 4.3.3 Efeito hipoglicêmico do complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV)

Em p[H] fisiológico, há a predominância das espécies  $VOL_2$  e  $VOH_1L$ . Estas espécies apresentaram efeito hipoglicêmico quando administradas intraperitonealmente em ratos diabéticos. Provavelmente a espécie ativa seja a  $VOH_1L$ , já que esta possui mais sítios de coordenação livre do que a espécie  $VOL_2$ . Porém, o complexo kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) não potencializou o efeito do vanádio sozinho.



## 5. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho os seguintes itens podem ser estudados:

- ❖ Estudar a relação estrutura-atividade dos diferentes compostos isolados da espécie vegetal *Bauhinia forficata*;
- ❖ Estudar o efeito e o mecanismo de ação do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo na captação de glicose nos tecidos periféricos alvos da insulina (músculo ou tecido adiposo);
- ❖ Estudar o complexo (kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo-VO(IV) no estado sólido.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva, K.L.; Cechinel-Filho, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova* 25 (3), 449-454, **2002**.
2. Achenbach, H.; Stocker, M.; Constenla, M.A.F. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry* 27 (6), 1835-1841, **1988**.
3. Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellani, D.C.; Dias, J.E. *Plantas Medicinais*. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, **1998**.
4. Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum, São Paulo, **1998**.
5. Silva, K.L.; Biavatti, M.W.; Leite, S.N.; Yunes, R.A.; Monache, F.D.; Cechinel-Filho, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae) *Zeitschrift für Naturforschung* 55, 478-480, **2000**.
6. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **2001**.
7. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035-1042, **2000**.
8. Juliani, C. Ação hipoglicemiante da unha de vaca. *Revista Medica de Pharmacia, Chimica e Physica* 2, 165-169, **1929**.
9. Juliani, C. Ação hipoglicemiante de *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos experimentais. *Revista Sudamericana de Endocrinologia Immunologia e Quimioterapia* 14, 326-334, **1931**.
10. Juliani, C. Ação hipoglicemiante da “*Bauhinia forficata*, Link” – Novos estudos clínicos e experimentais. *Jornal dos Clínicos* 3, 93-112, **1941**.

11. Caricati-Neto, A.; Pereira, O.C.M.; Bastos-Ramos, W.P. Effects of the aqueous and alcoholic extracts of *Bauhinia forficata* on blood glucose in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 18, 726A, **1985**.
12. Russo, E.M.K.; Reichelt, A.A.J.; de Sá, J.R.; Furlanetto, R.P.; Moisés, R.C.S.; Kasamatsu, T.S.; Chacra, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23, 11-20, **1990**.
13. Costa, O.A. Estudo farmacológico da unha de vaca. *Revista da Flora Medicinal* 9, 175-189, **1945**.
14. Pepato, M.T.; Keller, E.H.; Baviera, A.M.; Kettelhut I.C.; Vendramini, R.C.; Brunetti, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 191-197, **2002**.
15. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact138.html>, acessada em janeiro de 2003.
16. Champe, P.C.; Harvey, R.A. *Bioquímica Ilustrada*. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, **1996**.
17. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. *Farmacologia*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2000**.
18. Bragança, L.A.R. *Plantas Medicinais Antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar*. Editora da Universidade Federal Fluminense, Niterói, **1996**.
19. Schroeder, H.A.; Balassa, J.J.; Tipton, I.H. Abnormal trace metals in man – vanadium. *Journal Chronic Dis* 16, 1047-1071, **1963**.
20. Tsiani, E.; Fantus, I.G. Vanadium compounds biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends in Endocrinology Metabolism*. 8 (2), 51-58, **1997**.
21. Morinville, A.; Maysinger, D.; Shaver, A. From vanadis to atropos: vanadium compounds as pharmacology tools in cell death signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 19, 452-460, **1998**.

22. Rehder, D. The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angewandte Chemie-International Edition English* 30,148-167, **1991**.
23. Garcia, J.A.G. Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio. *Educación Química* 7 (4), 185-189, **1996**.
24. Pereira, M.T.C. *Dissertação de Mestrado: Síntese e caracterização de complexos de vanádio(III e IV) como modelos bioinorgânicos*. Universidade Federal de Santa Catarina, **1996**.
25. Badmaev, M.D.V.; Prakash, S.; Majeed, M. Vanadium: a review of its potential role in the fight against diabetes. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 5 (3), 273-291, **1999**.
26. Brichard, S.M.; Henquin, J.C. The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences* 16, 265-270, **1995**.
27. Allegretti, Y.; Ferrer, E.G.; Baró, A.C.G.; Williams, P.A.M. Oxovanadium(IV) complexes of quinic acid. Synthesis, characterization and potentiometric study. *Polyhedron* 19, 2613-2619, **2000**.
28. Tolman, E.L.; Barris, E.; Burns, M.; Pansini, A.; Partridge, R. Effects of vanadium on glucose metabolism *in vitro*. *Life Science* 25, 1159-1164, **1979**.
29. Shechter, Y.; Karlsh, S.J.D. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl(IV) ions. *Nature* 284, 556-558, **1980**.
30. Dubyak, G.R.; Kleinzeller, A. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as (Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup>)-ATPase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 255, 5306-5312, **1980**.
31. Clark, A.S.; Fagan, J.M.; Mitch, W.E. Selectivity of insulin-like actions of vanadate on glucose and protein metabolism in skeletal muscle. *Biochemical Journal* 232, 273-276, **1985**.
32. Duckworth, W.C.; Solomon, S.S.; Liepnieks, J. Hamel, F.G.; Hand, S.; Peavy, D.E. Insulin like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, 122, 2285-2289, **1988**.

33. Shechter, Y.; Ron, A. Effect of depletion of bicarbonate or phosphate ions on insulin action in rat adipocytes. Further characterization of the receptor-effector system. *Journal Biological Chemistry*, 261, 14951-14954, **1986**.
34. Heyliger, C.E.; Tahiliani, A.G.; McNeill, J.H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*, 227, 1474-1477, **1985**.
35. Tsuji A.; Sakurai, H. Vanadyl ion suppresses nitric oxide production from peritoneal macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 226, 506-511, **1996**.
36. Thompson, K.H.; Leichter, J.; McNeil, J.H. Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ-diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197 (3), 1549-1555, **1993**.
37. Yuen, V.G.; Vera, E.; Battell, M.L.; Li, W.M.; McNeil, J.H. Acute and chronic oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV) in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 43, 9-19, **1999**.
38. Willsky, G.R.; Goldfine, A.B.; Kostyniak, P.J.; McNeil, J.H.; Yang, L.Q.; Khan, H.R.; Crans, C.D. Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: *in vivo* and *in vitro* studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Journal of Inorganic Biochemistry* 85, 33-42, **2001**.
39. Woo, L.C.Y.; Yuen, V.G.; Thompson, K.H.; McNeil, J.H.; Orvig, C. Vanadyl-biguanide complexes as potential synergistic insulin mimics. *Journal of Inorganic Biochemistry* 76, 251-257, **1999**.
40. Yasui, H.; Tamura, A.; Takino, T.; Sakurai, H. Structure-dependent metallokinetics of antidiabetic vanadyl-picolinate complexes in rats: studies on solution structure, insulinomimetic activity and metallokinetics. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91, 327-338, **2002**.
41. Kiss, E.; Garribba, E.; Micera, G.; Kiss, T.; Sakurai, H. Ternary complex formation between VO(IV)-picolinic acid or VO(IV)-6-methylpicolinic acid and small blood serum bioligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 78, 97-108, **2000**.

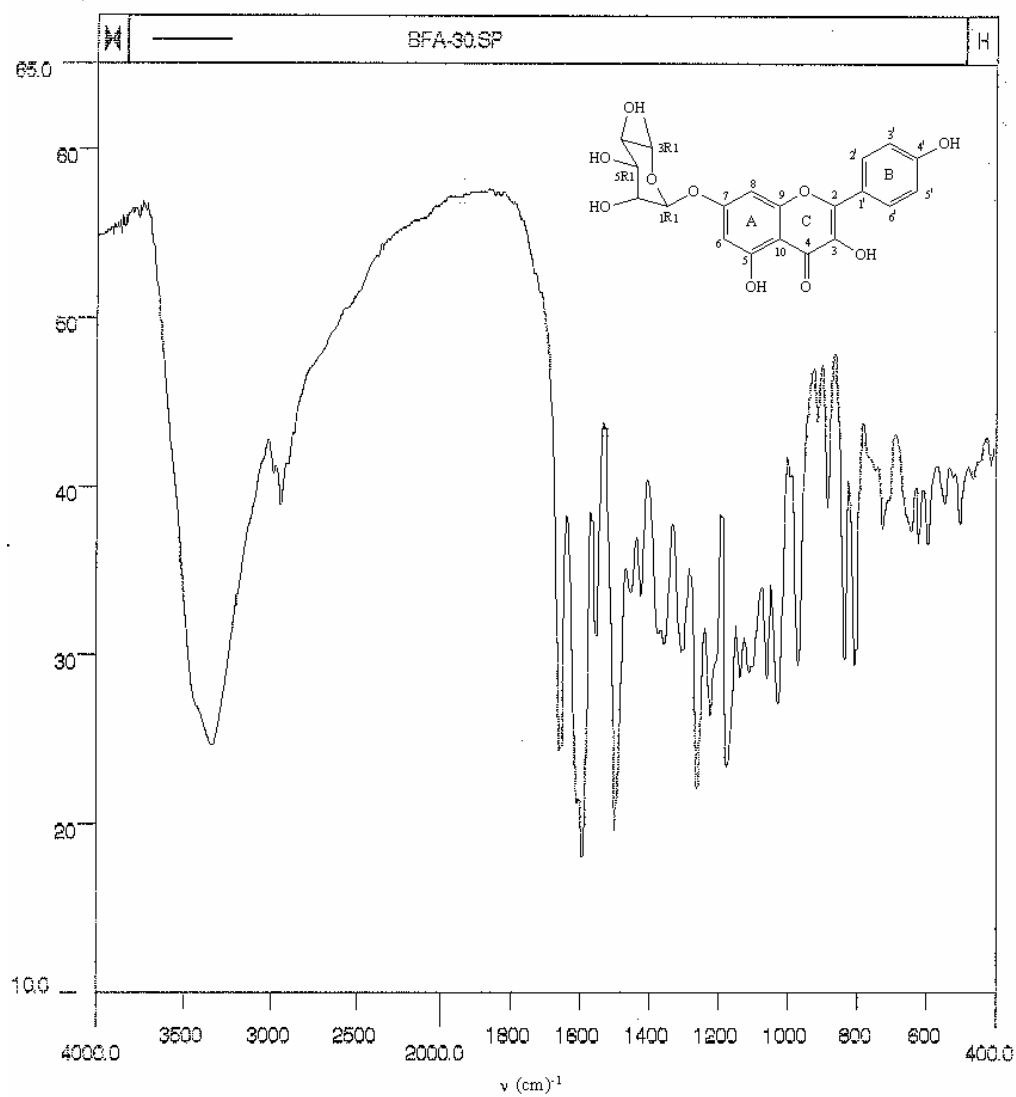
42. Sakurai, H.; Watanabe, H.; Tamura, H.; Yasui, H.; Matsushita, R.; Takada, J. Insulin-mimetic vanadyl-dithiocarbamate complexes. *Inorganica Chimica Acta* 283, 175-183, **1998**.
43. Sakurai, H.; Kojima, Y.; Yoshikawa, Y.; Kawabe, K.; Yasui, H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes *Coordination Chemistry Reviews* 00, 1-12, **2001**.
44. Furnan, N. *Standard methods of chemical analysis*. D.Van Nortand Company Inc., 1211-1213, **1962**.
45. Clarke, E., Martell, A.E. Potenciometric and Spectrophotometric Determination of Stabilities of In(III), Ga(III) and Fe(III) Complexes of N,N',N''-tris-(3,5-dimethyl-2-hydroxybenzyl)-1,4,7-triazacyclononane. *Inorganica Chimica Acta*, 186, 103-111, **1991**.
46. Martell, A.E., Motekaitis, R.J. *The determination and use of stability constants*. New York: VCH publishers, **1992**.
47. Jafri, M. A.; Aslam M.; Javed, K.; Singh S. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 309-314, **2000**.
48. Snedecor, G. W.; Cochran, W. G. *Correlation In: Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames, USA, **1973**.
49. Agrawal P.K. *Studies in organic chemistry 39. Carbon-13 NMR of flavonoids*. Elsevier, New York, **1989**.
50. Kaouadji, M. Acylated and non-acylated kaempferol monoglycosides from *Platanus acerifolia* buds. *Phytochemistry*, 29 (7), 2295-2297, **1990**.
51. Aragão, P.C.A.; Toledo, J.B.; Morais, A.A.; Braz-Filho, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Química Nova*, 13 (4), 254-259, **1990**.
52. Sabri, I.; El-Negoumy; El-Sayed; Mabry, T.J. *Rev. Latinoamer. Quim.*, 18, 88, **1987**.
53. Verspohl, E.J. Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*, 68, 581-590, **2002**.

54. Sousa, E. *Trabalho de Conclusão de Curso*: Obtenção de flavonóides glicosilados para estudos de complexação com metais e avaliação da atividade hipoglicêmica de *Bauhinia forficata*., Universidade Federal de Santa Catarina, **2001**.
55. Almeida, R.N.; Agra, M.F. Levantamento bibliográfico da flora medicinal de uso no tratamento da diabetes e alguns resultados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*, 67, 105-110, **1986**.
56. Islas-Andrade, S.; Monsalve, M.C.R.; de la Peña, J.E.; Polanco, A.C.; Palomino, M.A.; Velasco, A.F. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochem. Cytochem.* 33 (3), 201-208, **2000**.
57. Ravel, R. Laboratório clínico. Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. Editora Guanabara Koojan, **1997**.
58. Meyerovitch, J.; Shechter, Y.; Amir, S. Vanadate stimulates *in vivo* glucose uptake in brain and arrests food intake and blood weight gain in rats. *Physiology and Behavior*, 45, 1113-1116, **1989**.
59. Yuen, V.G.; Caravan, P.; Gelmini, L.; Glover, N.; McNeil, J.H.; Setyawati, I.A.; Zhou, Y.; Orvig, C. Glucose-lowering properties of vanadium compounds: comparison of coordination complexes with maltol or kojic acid as ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 110-116, **1997**.
60. Goldfine, A.B.; Simonson, D.C.; Folli, F.; Patti, M.E.; Kahn, C.R. *In vivo* and *in vitro* studies of vanadate in human and rodent diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 153, 217-231, **1995**.
61. Domingo, J.L.; Gomez, M.; Sanchez, D.J.; Llobet, J.M.; Keen, C.L. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 153, 233-240, **1995**.
62. Crans, D.C. Chemistry and insulin-like properties of vanadium(IV) and vanadium(V) compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80, 123-131, **2000**.

**ANEXO**  
Coleção de espectros

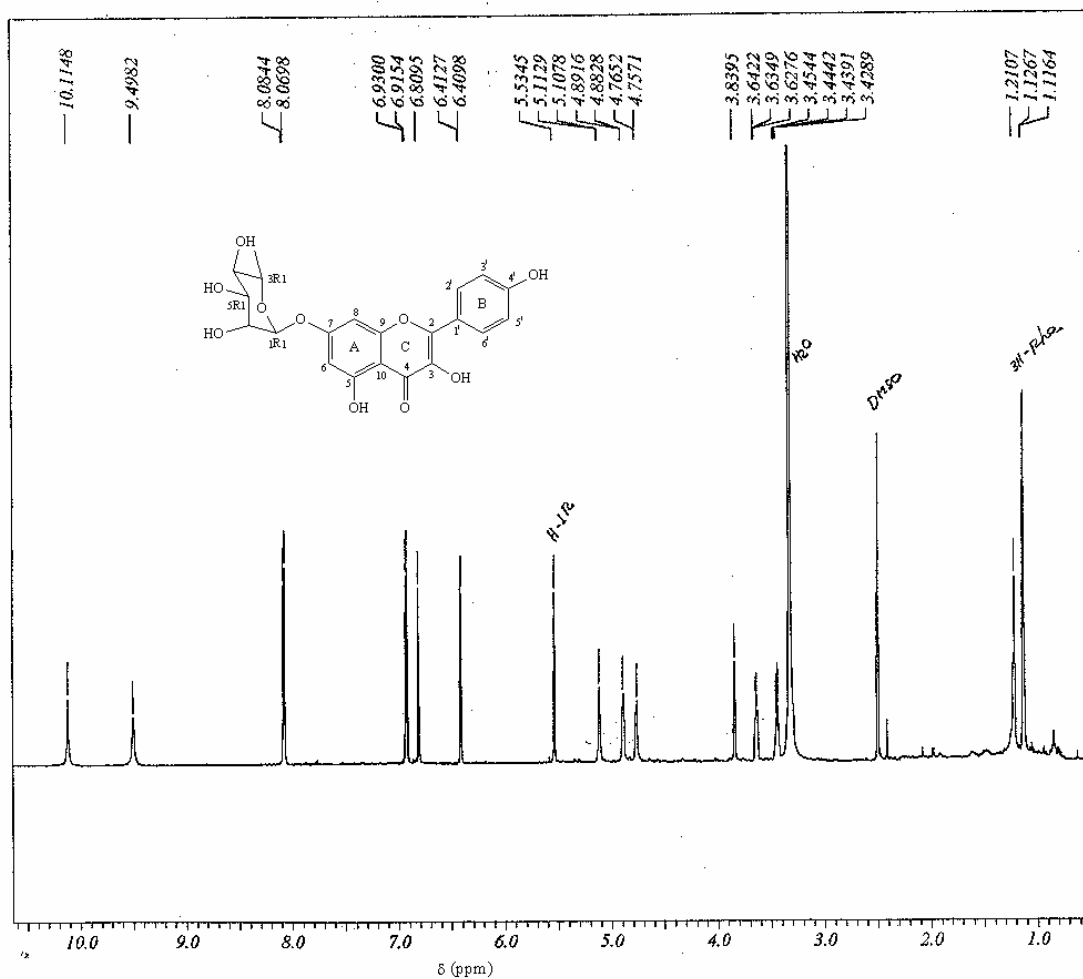


## Espectro 1

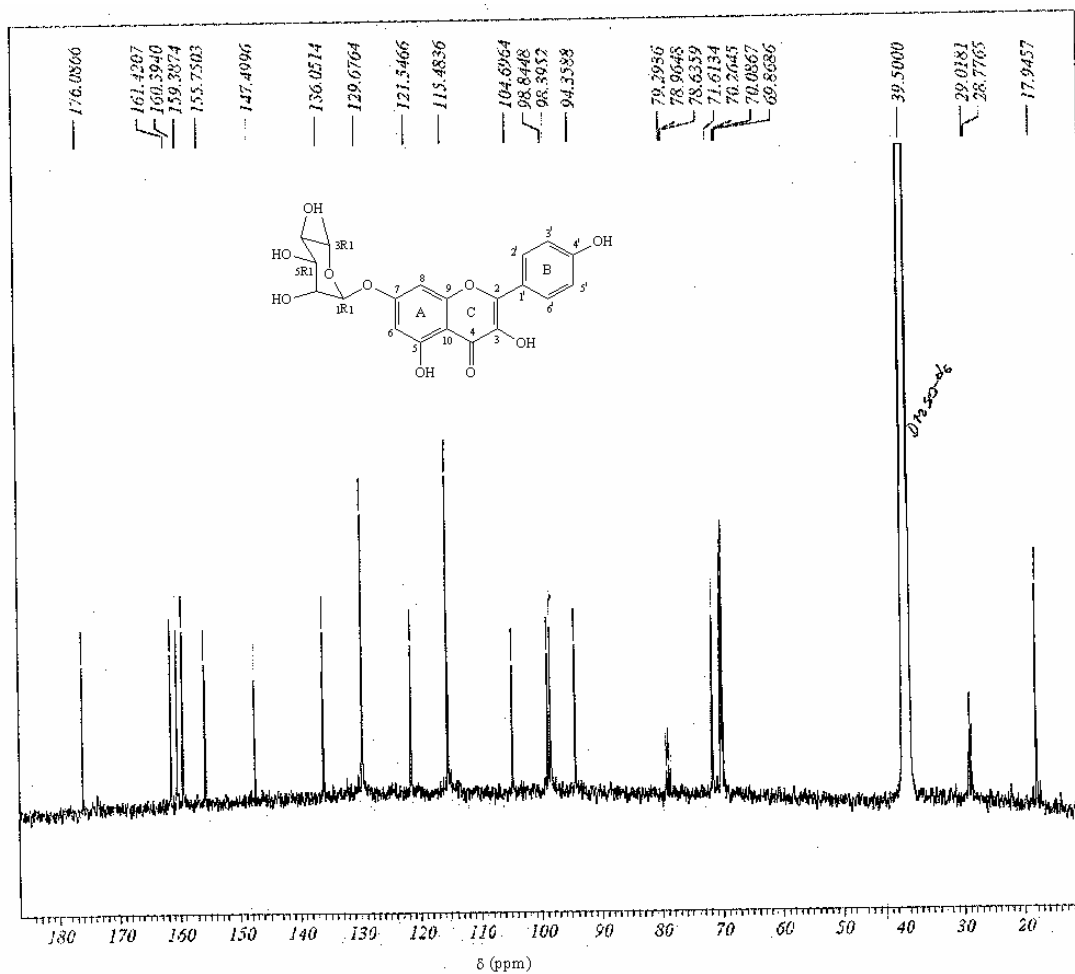


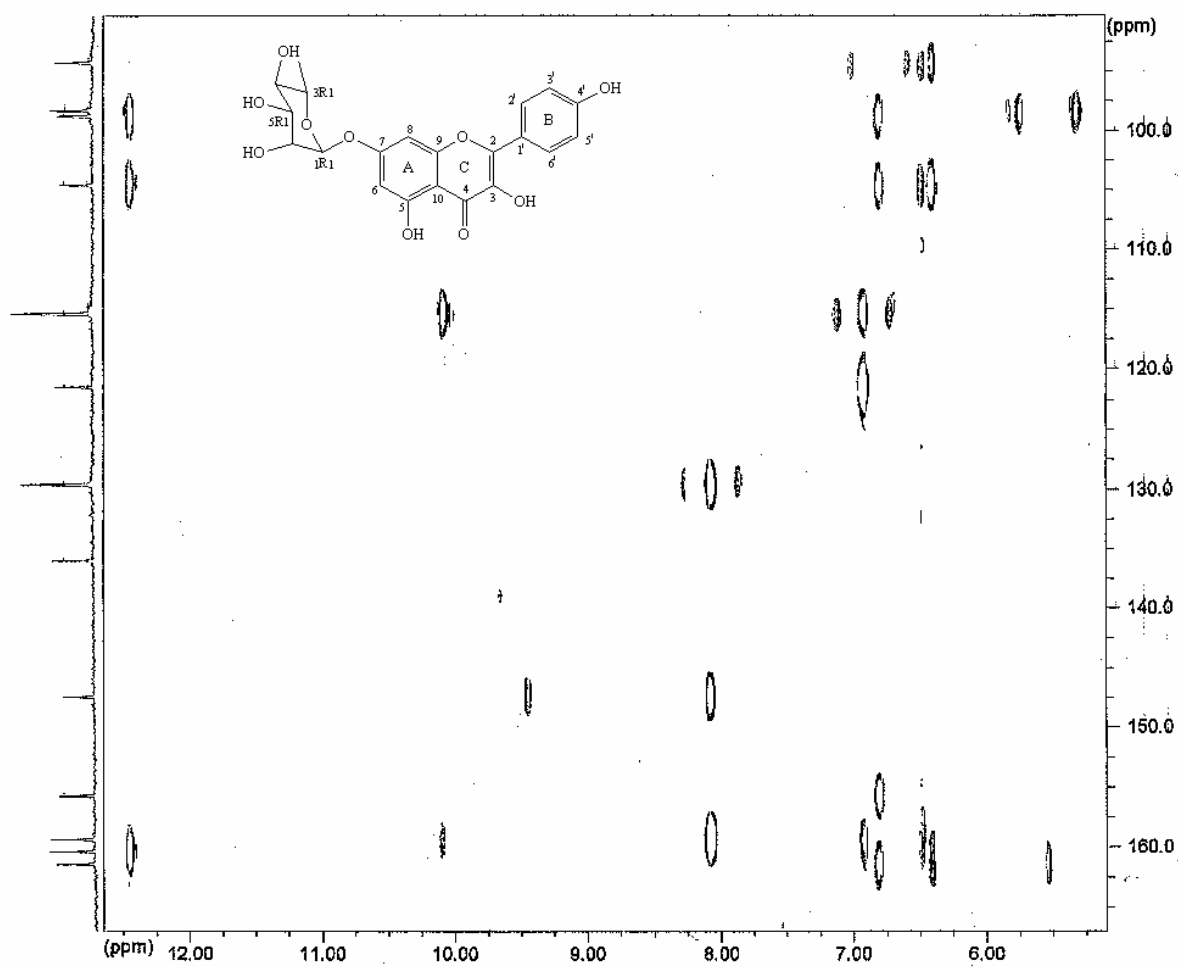
Espectro de IV, em pastilha de KBr, do kaenferol-7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (2).

## Espectro 2

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (2).

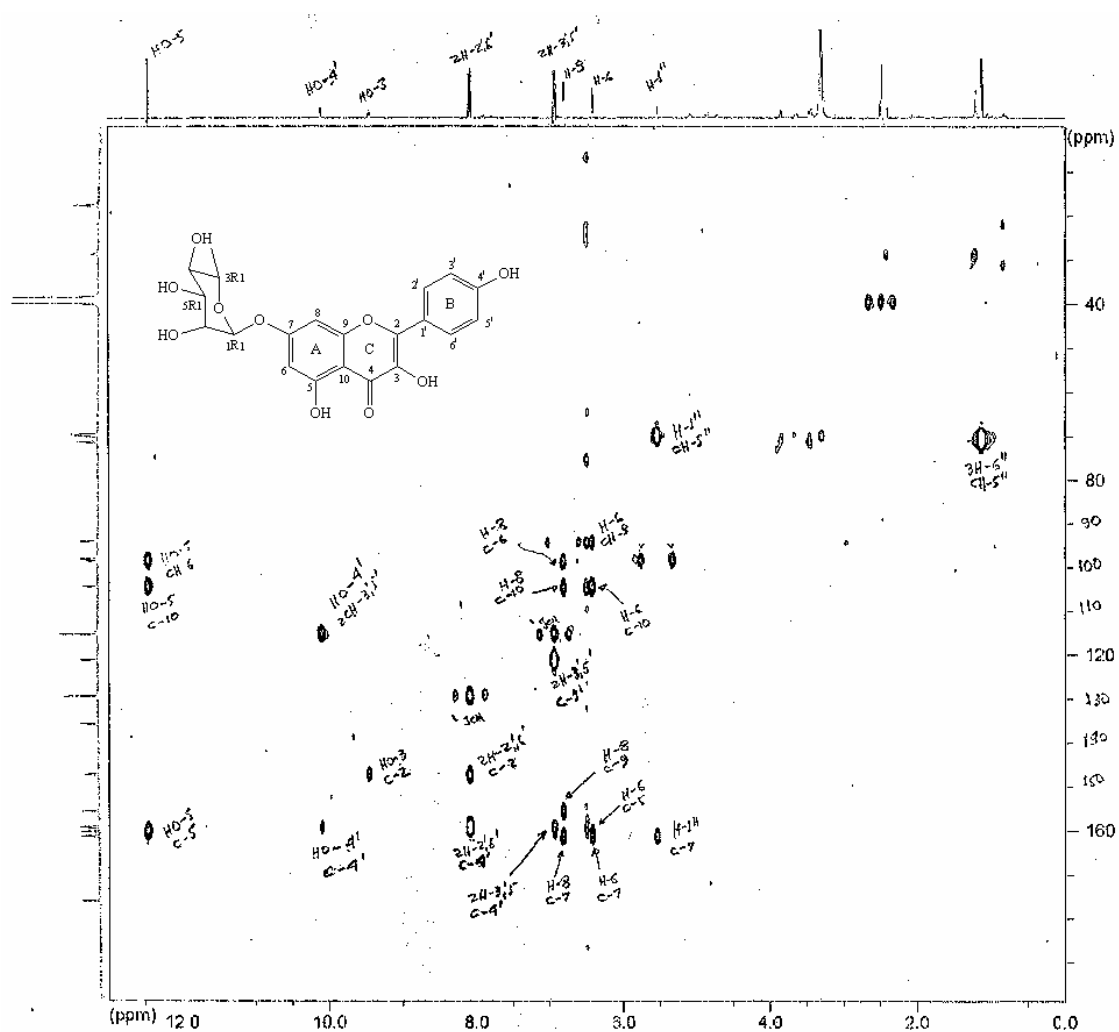
## Espectro 3

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaenferol-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (2).

**Espectro 4**

Espectro de HMQC (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do kaenferol-7-O-(α) diramnosídeo (2).

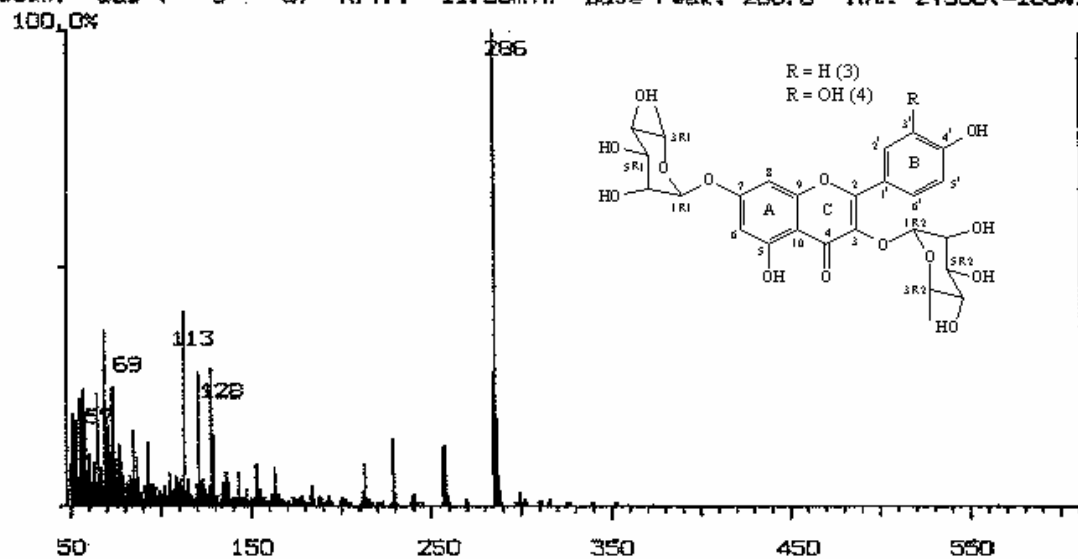
## Espectro 5

Espectro de HMBC (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do kaenferol-7-O-(α) diramnosídeo (2).

## Espectro 6

Mass Spectrum File: BF98 .01 98-07-28 19:59  
Comment: Amostra BF98 (Eliandra)

Scan: 329 ( 0- 0) R.T.: 11.83min Base Peak: 286.0 Int: 27560(=100%)  
100.0%

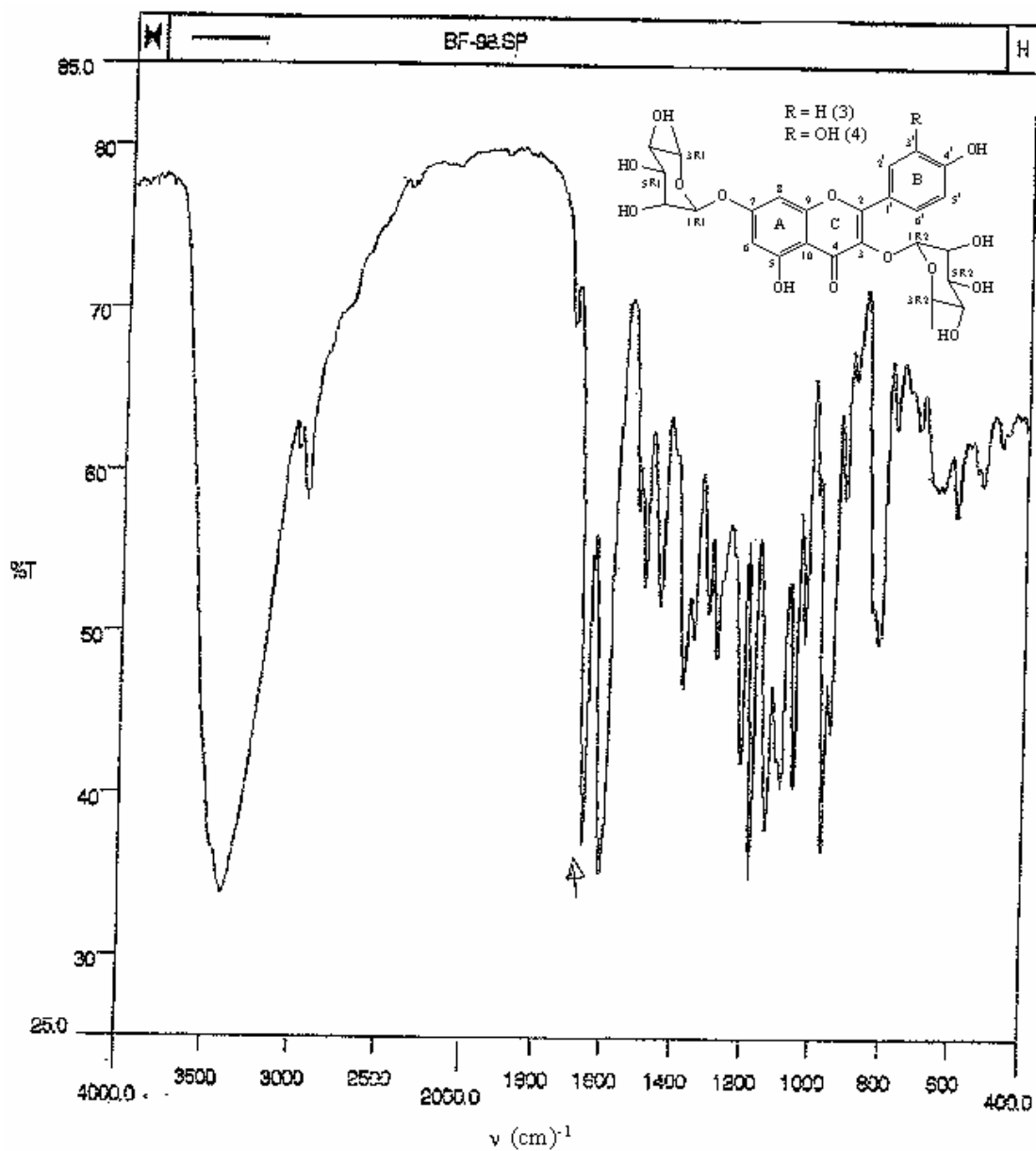


<SPECT>

1. BaseP	2. MsRng	3. Thres	4. Magni	5. Peak	6. Int*2	7. Int/2	8. Init	9. MoreK	10. Exit
----------	----------	----------	----------	---------	----------	----------	---------	----------	----------

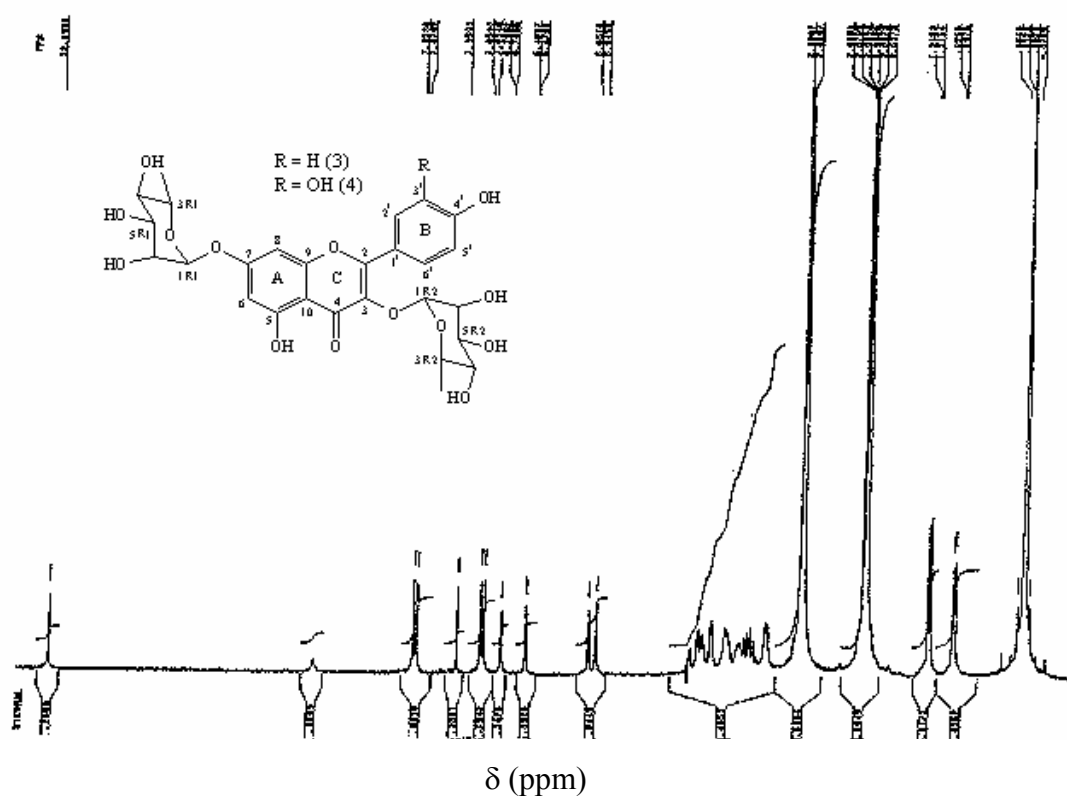
Espectro de Massas do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (3) e quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (4).

## Espectro 7



Espectro de IV, em pastilha de KBr, do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (3) e da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (4).

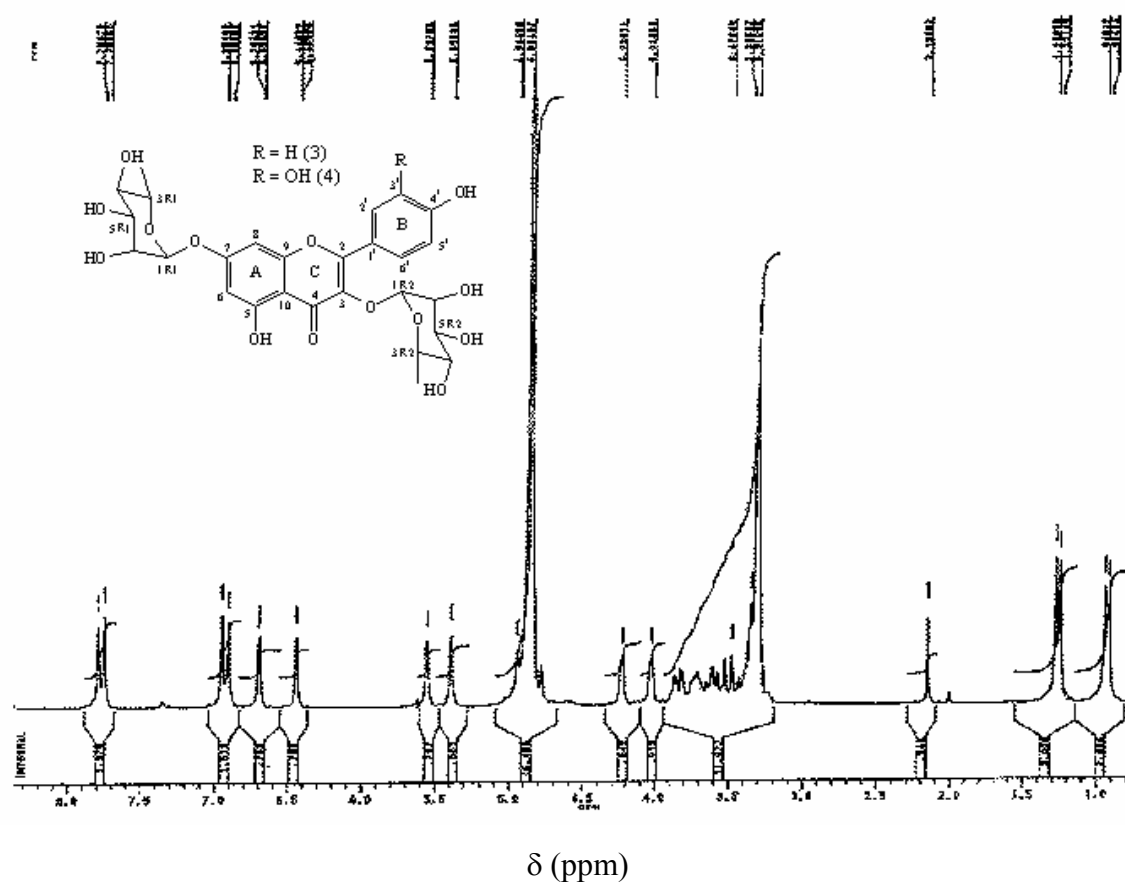
## Espectro 8



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (3) e da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo (4).

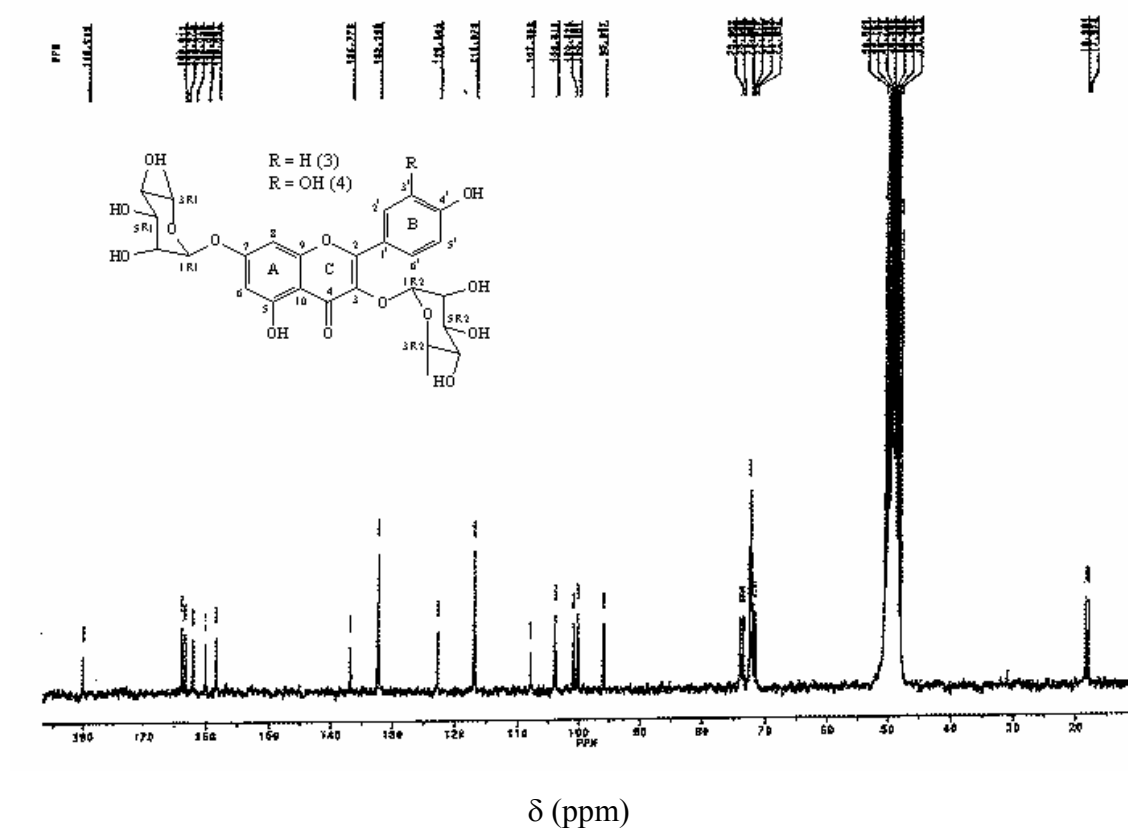


## Espectro 9



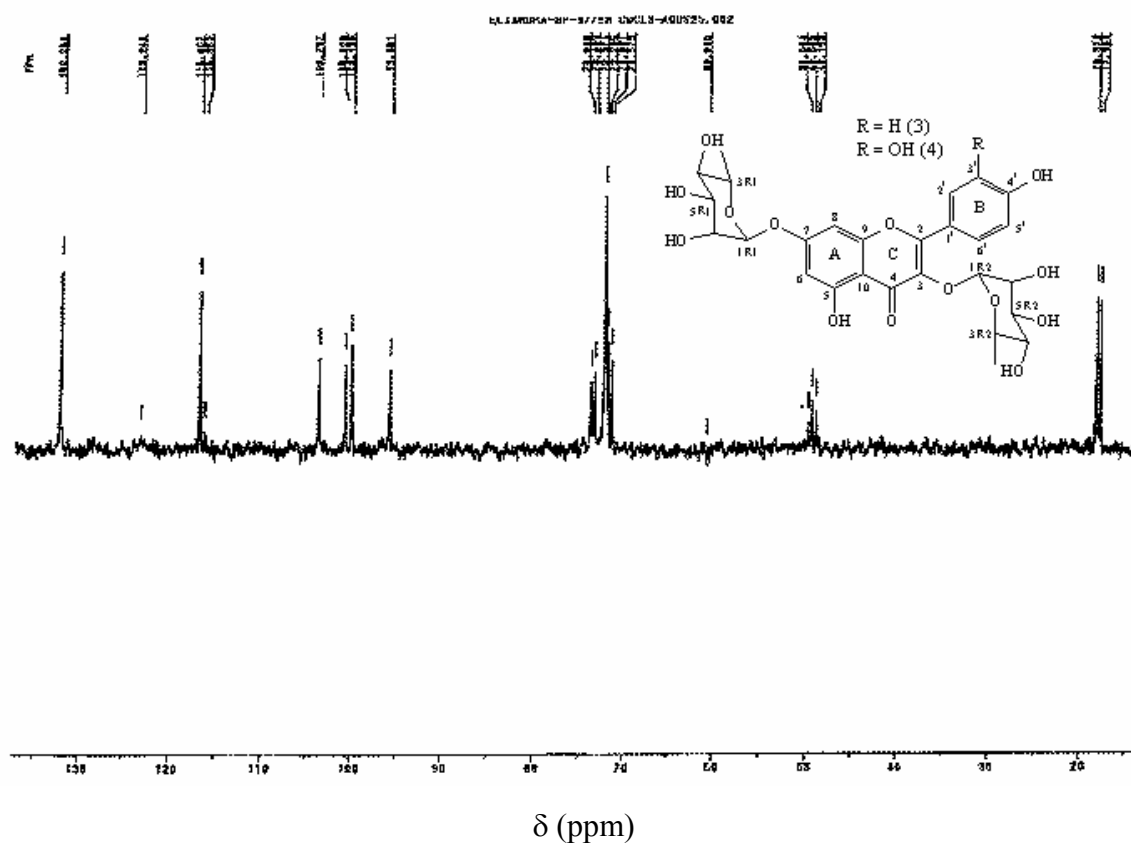
Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (3) e da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (4).

## Espectro 10



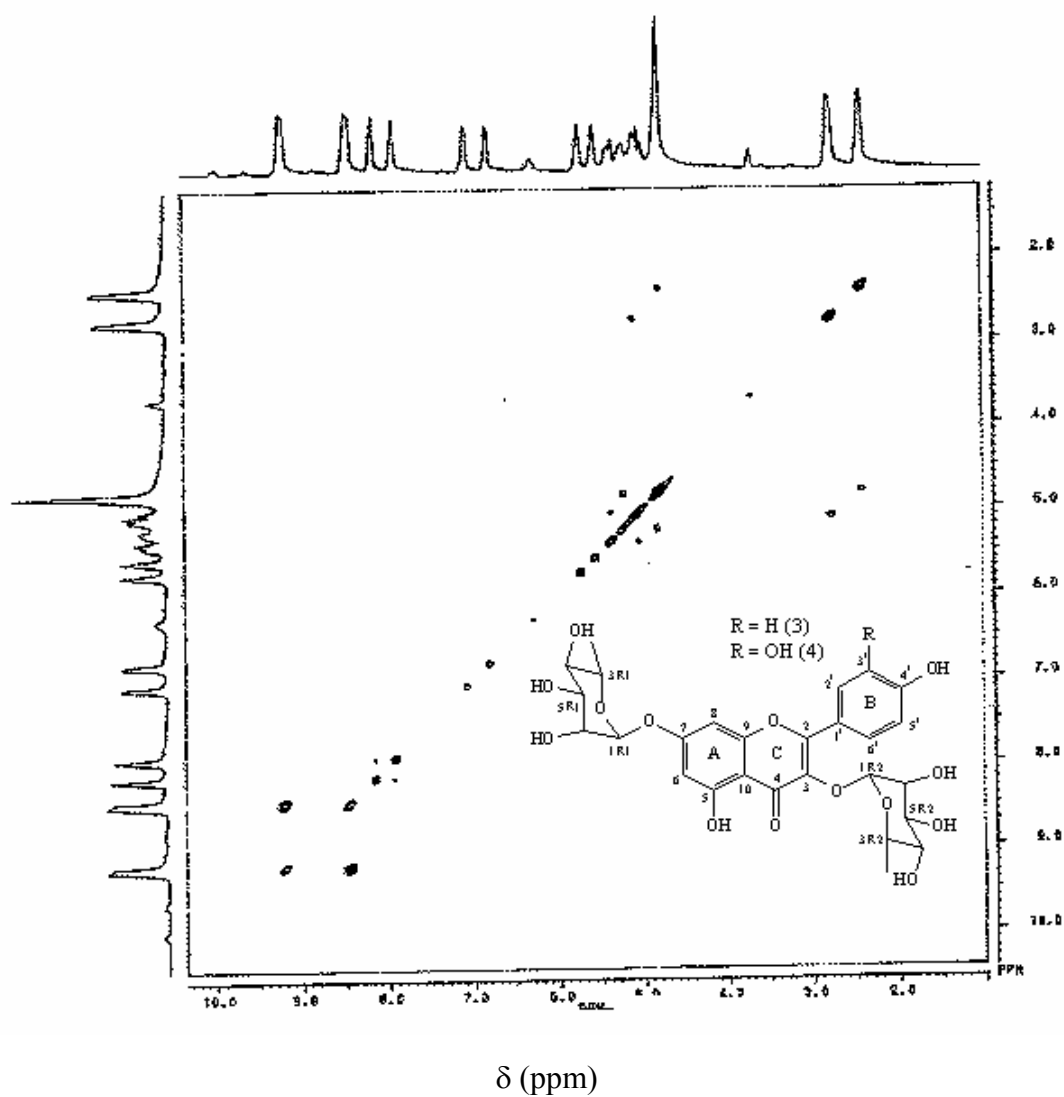
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (3) e da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (4).

## Espectro 11



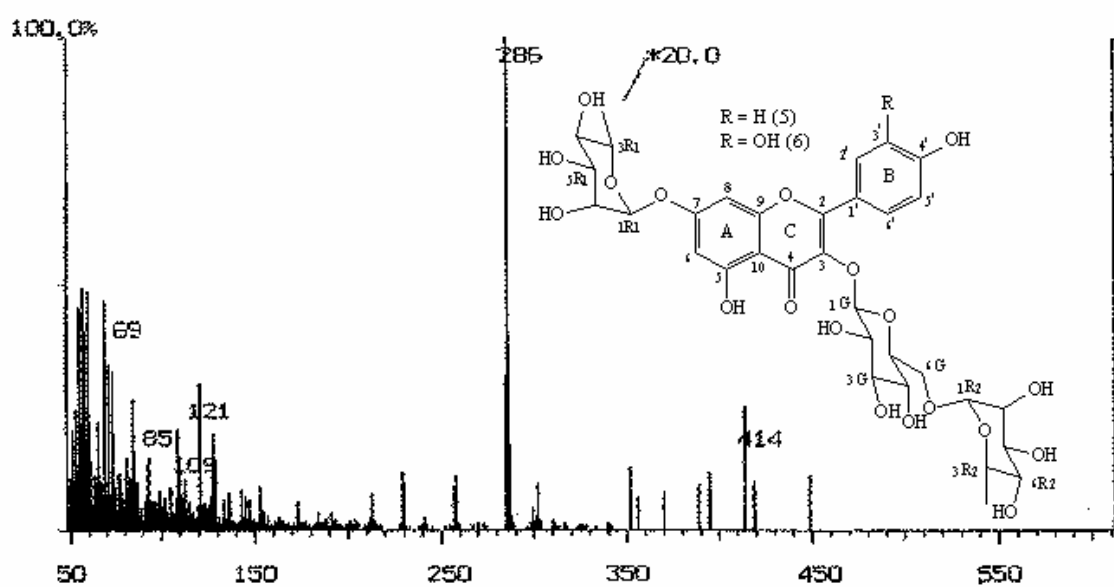
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do kaenferol-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (3) e da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (4).

## Espectro 12



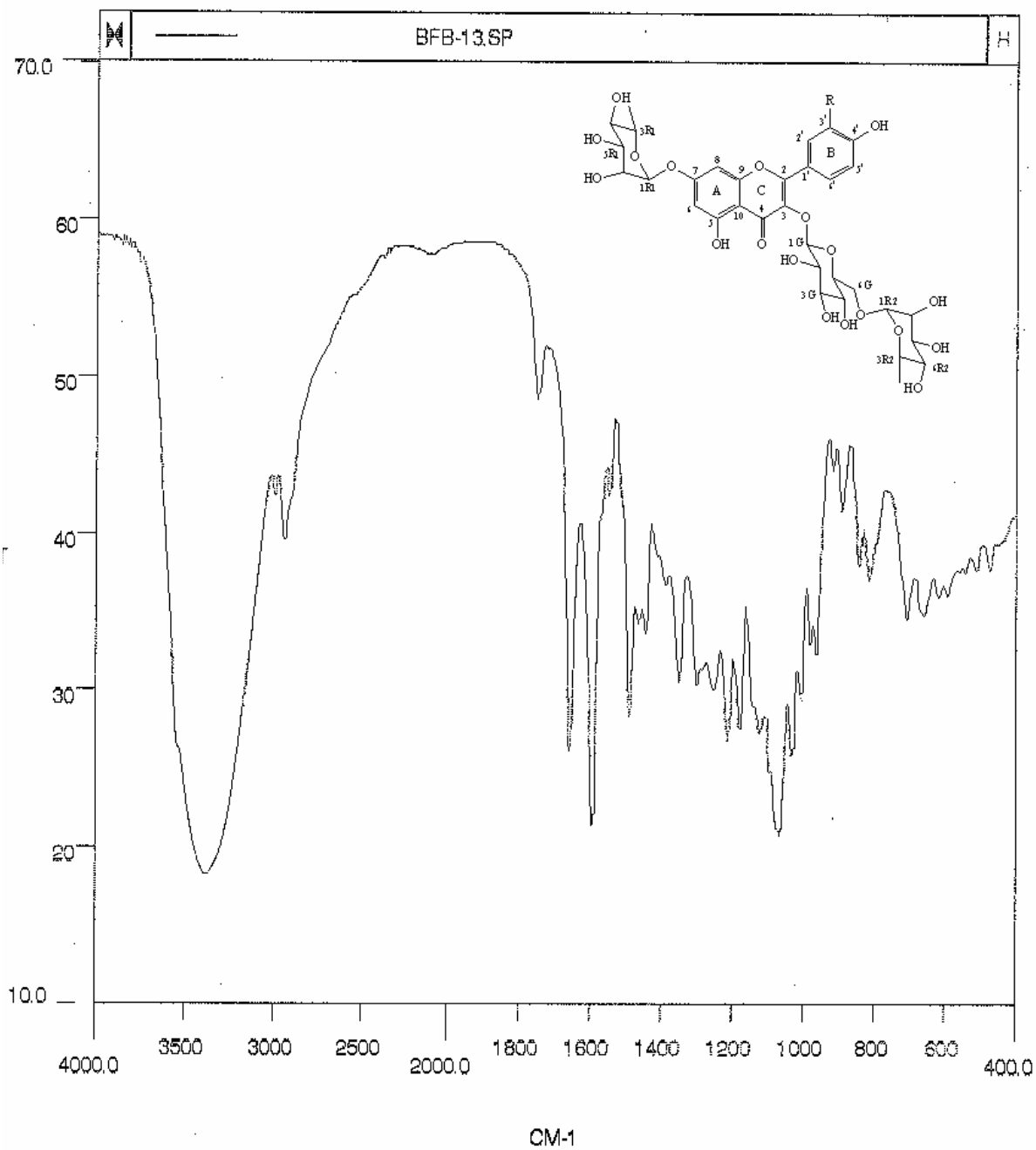
Espectro de COSY (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (3) e da quercetina-3,7-O-( $\alpha$ ) diramnosídeo (4).

## Espectro 13



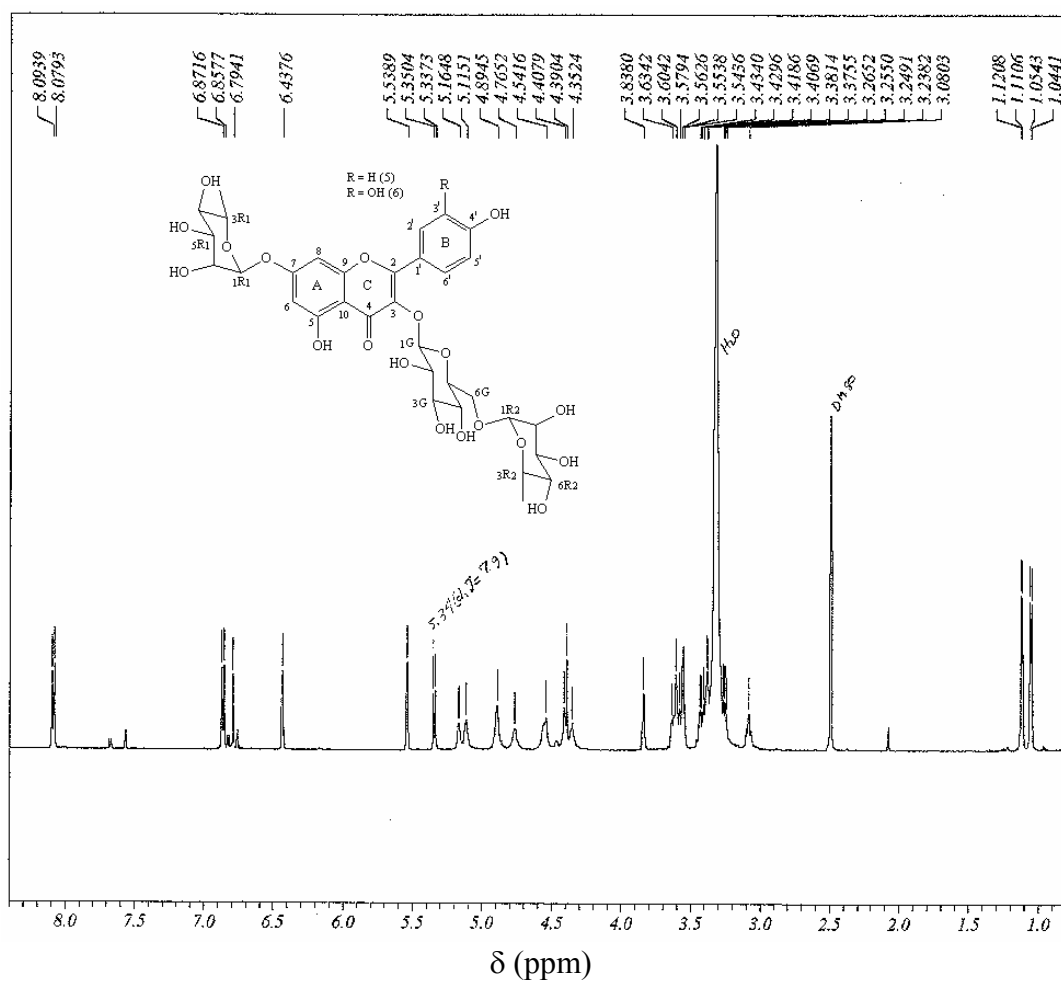
Espectro de Massas do kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (5) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (6).

## Espectro 14



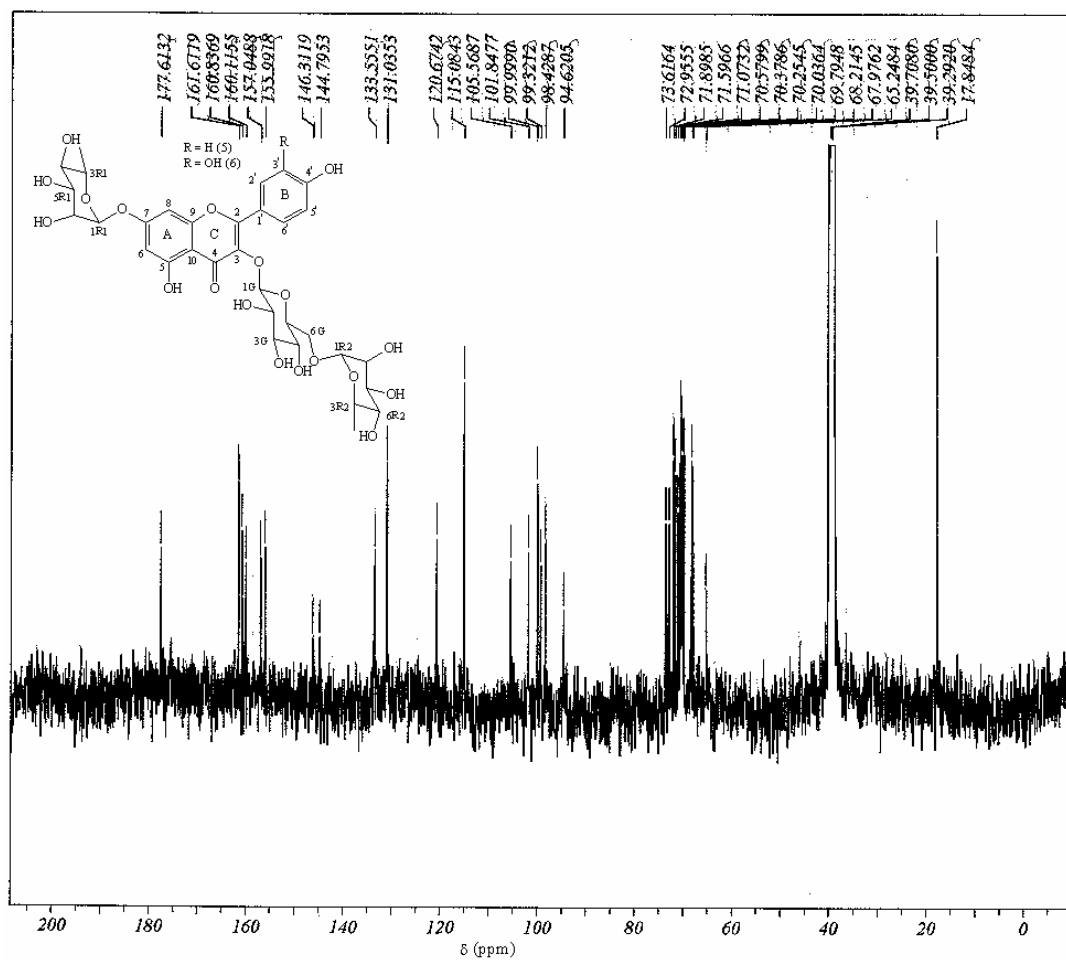
Espectro de IV, em pastilha de KBr, kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (**5**) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (**6**).

## Espectro 15



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6''')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**5**) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6''')-ramnnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnnosídeo (**6**).

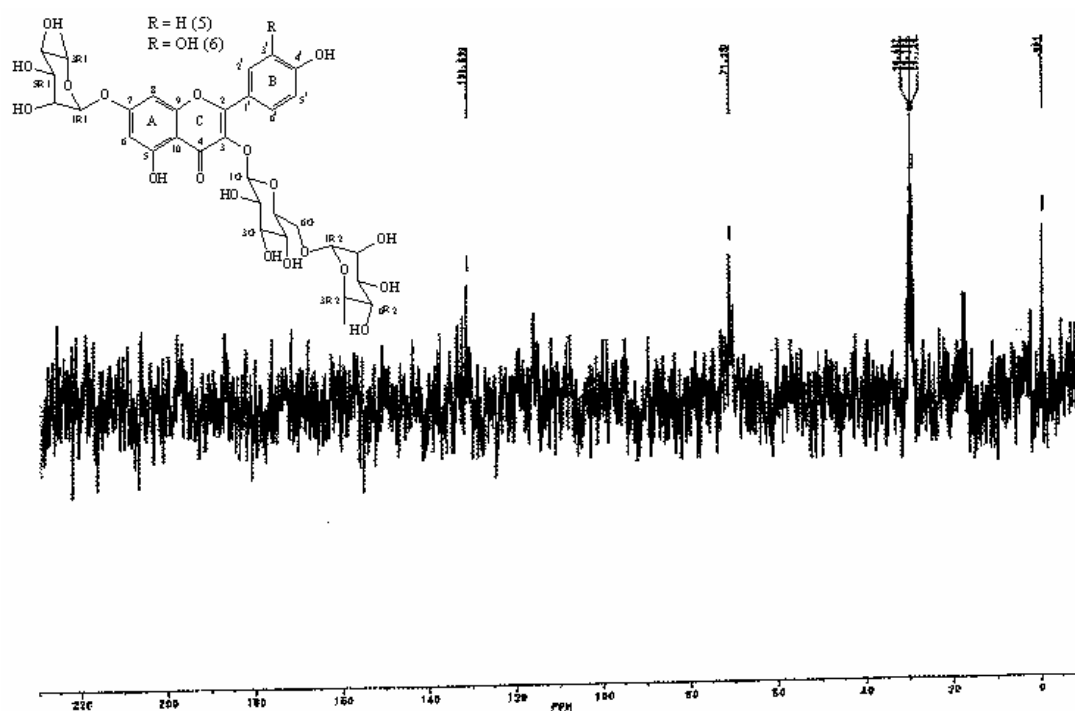
## Espectro 16



Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glucosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (5) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glucosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (6).

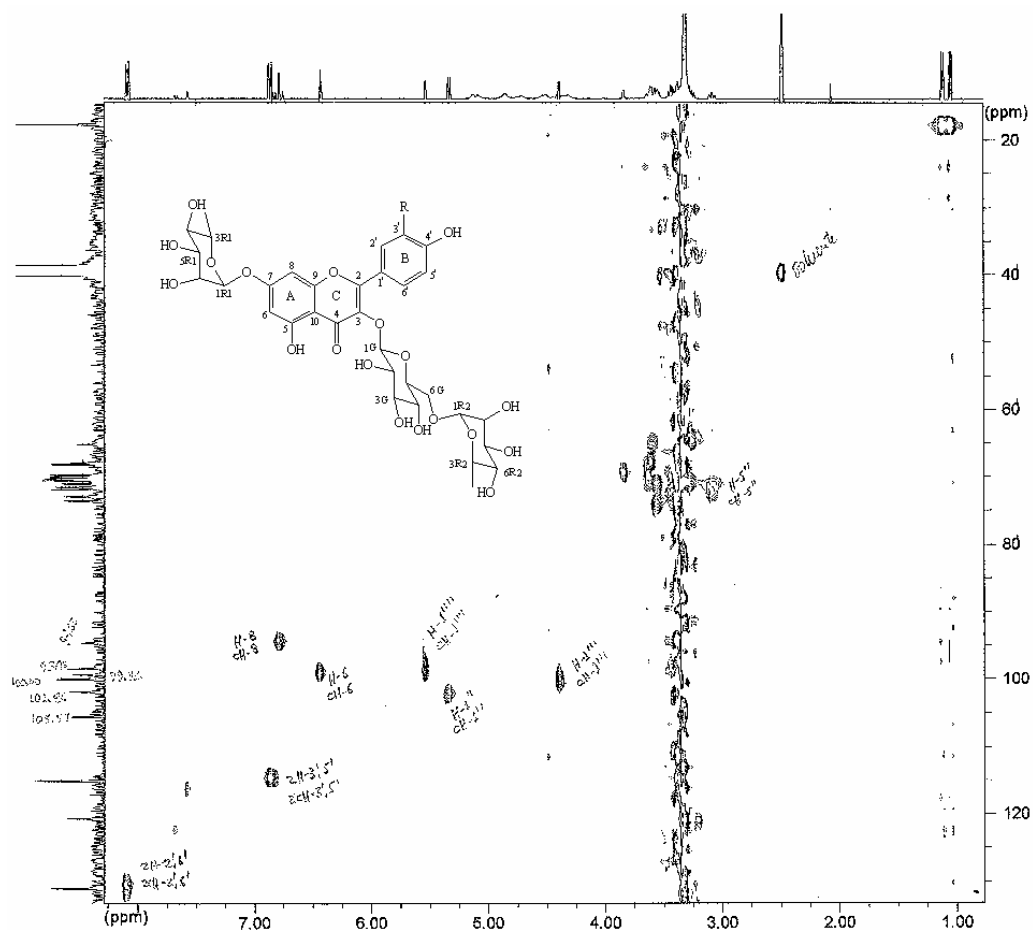


## Espectro 17

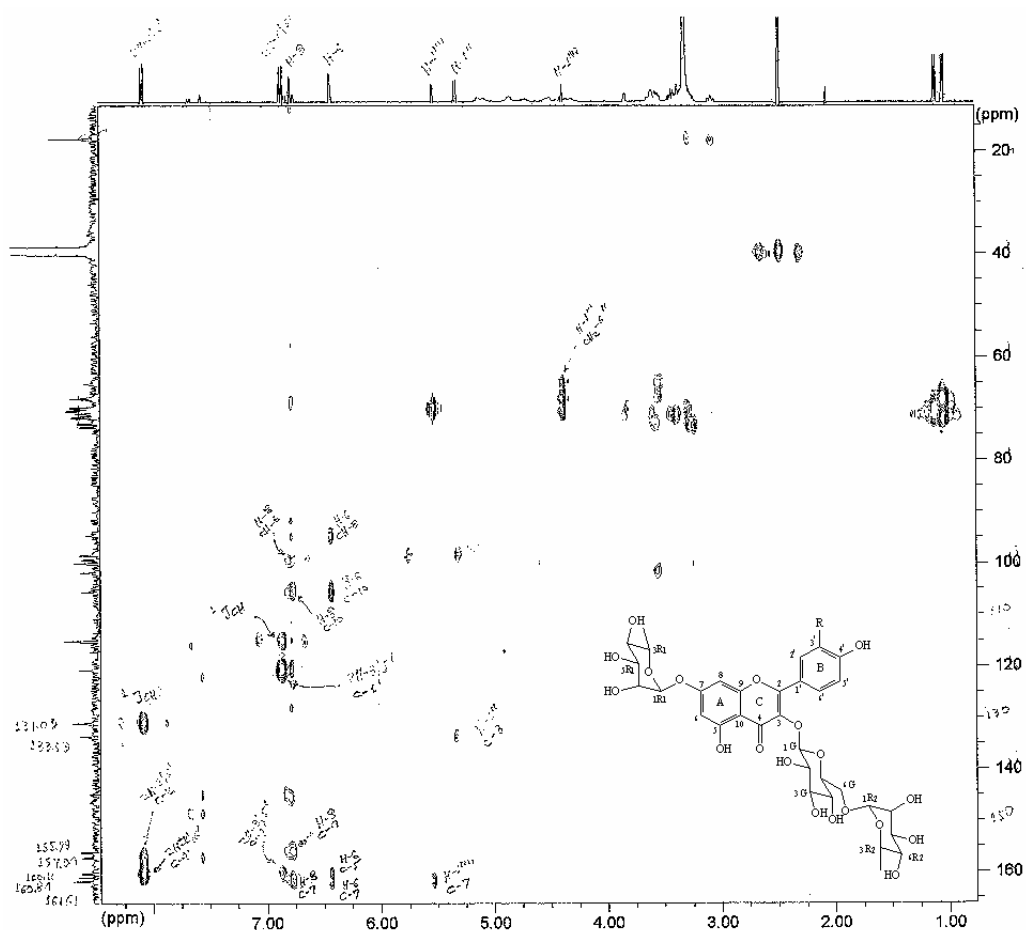


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do kaenferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (5) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (6).

## Espectro 18



Espectro de HMQC (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaempferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (**5**) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (**6**).

**Espectro 19**

Expansão do espectro de HMQC (150 MHz, DMSO- $d_6$ ) do kaempferol-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (**5**) e da quercetina-3-O-( $\alpha$ )-glicosídeo-(1'''-6'')-ramnosídeo-7-O-( $\alpha$ )-ramnosídeo (**6**).